

EGYETEMI DOKTORI (Ph. D.) ÉRTEKEZÉS

CASPOFUNGIN, MICA FUNGIN ÉS NIKKOMYCIN *Z IN VITRO* HATÉKONYSÁGÁNAK VIZSGÁLATA MIKRO- ÉS MAKRODILÚCIÓS MÓDSZEREKKEL A FONTOSABB *CANDIDA* FAJOK ELLEN

Földi Richárd

Témavezető: Dr. Majoros László



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2012

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Fontosabb rövidítések	4
1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés	8
2.1. Gombák általános jellemzése.....	8
2.2. A <i>Candida</i> fajok patogenezise, virulencia faktoraik	9
2.3. Epidemiológia.....	12
2.4. Antifungális szerek	13
2.4.1. Polién típusú antifungális szerek.....	14
2.4.2. Azol típusú antifungális szerek.....	15
2.4.3. 5-fluorocitozin.....	16
2.4.4. Echinocandinok.....	16
2.4.4.1. <i>Farmakológiai tulajdonságok</i>	16
2.4.4.2. <i>Az echinocandinok hatásspektruma</i>	18
2.4.4.3. <i>Farmakokinetikai tulajdonságok</i>	19
2.4.4.4. <i>Farmakodinámiai tulajdonságok</i>	20
2.4.4.5. <i>Klinikai hatékonyság, tanulmányok</i>	21
2.4.4.6. <i>Humán szérum</i>	22
2.4.5. Nikkomycin Z.....	23
2.4.6. <i>Candida</i> fajok antifungális szerekkel szembeni rezisztenciái.....	25
2.5. Paradox növekedés	28
3. Célkitűzés	32
4. Anyagok és módszerek	33
4.1. A vizsgált gombafajok eredete	33
4.2. Érzékenység meghatározása mikrodilúciós módszerrel	33
4.3. Az antifungális hatás vizsgálata idő-ölés görbék segítségével	34
5. Eredmények	36
5.1. Micafungin iránti érzékenység vizsgálata mikrodilúciós módszerrel.....	37
5.2. Az idő-ölés kísérletek eredményei micafungin esetében.....	37
5.3. <i>Candida</i> fajok caspofunginra és nikkomycin Z-re vonatkoztatott MIC értékei	43
5.4. Idő-ölés kísérletek eredményei RPMI-1640 tápközegben caspofungin és nikkomycin Z esetében	44

5.4.1. A caspofungin gombaellenes hatása az idő függvényében	44
5.4.2. A nikkomycin Z gombaellenes hatása az idő függvényében	47
5.4.3. Az idő-ölés kísérletek eredményei caspofungin + nikkomycin Z kombináció esetében	47
5.4.4. Idő-ölés kísérletek eredményei RPMI-1640+50% humán szérum tápközegben	50
5.5. A kísérleti munkában részt vevő társszerzők munkájának ismertetése	56
6. Megbeszélés	57
7. Összefoglalás	63
8. Summary	64
9. Köszönetnyilvánítás.....	65
10. Irodalomjegyzék	66
11. Tárgyszavak – Keywords.....	85
12. Függelék.....	88

Fontosabb rövidítések

AMB: amphotericin B

ANI: anidulafungin

CAS: caspofungin

CFU: Colony Forming Unit

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

FLU: flukonazol

ITRA: itrakonazol

MIC: minimális gátlási koncentráció

MICA: micafungin

NIK: nikkomycin Z

PG: paradox növekedés

PKC: protein kináz C

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

VOR: vorikonazol

1. Bevezetés

A súlyos gombafertőzések közel 90%-áért a különböző *Candida* fajok tehetők felelőssé (Kontoyiannis és munkatársai 2003). Mint a normál flóra tagjai, megtalálhatóak az egészséges szervezetben, de az opportunistá fertőzések, illetve az orvosi beavatkozások következtében számuk jelentősen megnövekedhet (Ludwig és mtsai. 2009). A *Candida* fajokat a negyedik (8-10%) leggyakoribb nozokomiális szepszist előidéző patogénként tartják számon világszerte (Wisplinghoff és mtsai. 2004). A leggyakrabban izolált kórokozó, melyet egyben a legvirulensebb is, a *Candida albicans*, azonban az 1990-es évektől a nem-*albicans Candida* fajok által okozott megbetegedések száma is megnövekedett. Bár ezeknek a speciesteknek kisebb a virulenciája, az általuk okozott mortalitás a leggyakoribb az opportunistá mikózist okozó gombák között, fajtól függően a 40-80%-ot is elérheti (Pfaller és mtsai. 2004a). A sorban őket követik a *Zygomycetes*-ek 30%-kal és az *Aspergillus*-ok 23%-kal (Rees és mtsai. 1998). Az antifungális szerek lényeges fejlődése ellenére a candidémia mortalitása magas maradt (Pfaller és mtsai. 2004a).

Számos prediszponáló tényező hozzájárul a megnövekedett számú gombás fertőzésekhez. A legfontosabbak közé tartozik a nyálkahártyának és a bőrnek, mint barriernek a károsodása, a neutrofil sejtek nem megfelelő működése, anyagcsere rendellenességek, a sejtek által mediált immunitás elégtelensége és a túl alacsony vagy magas életkor (<1 és >70 év) (Segal és mtsai. 2006). Emellett a széles spektrumú antibiotikumok használata, a citotoxikus kemoterápiák és a szerv transzplantációk tovább növelik a gombás fertőzések kialakulásának lehetőségét (Pfaller és mtsai. 2007).

A klinikumban előforduló *Candida* speciestek közül szinte mindegyik képes különböző felületeken biofilmet képezni. A képződött biofilm egyrészt fertőzési gócként szerepelhet, másrészt nehezen átjárható barrier az antifungális szerek számára (Hazen és mtsai. 2001). Ha a beteg katéterezésen esett át, akkor a klinikai vizsgálatok elsődlegesen az echinocandinokat ajánlják a katéterhez társuló, *Candida* fajok okozta biofilm képzés kezelésére (Glöckner és mtsai. 2008), de minden más esetben a terápia megkezdése előtt a katéter eltávolítása ajánlott (Shin és mtsai. 2002).

Az *in vitro* antifungális érzékenységi vizsgálatok fontos szerepet töltenek be a megfelelő terápiához szükséges gyógyszer kiválasztásában, a gyógyszerfejlesztési kísérletekben és az antifungális rezisztencia fejlődésének nyomon követésében (Pfaller 2005a, Rex és mtsai. 2002).

Vizsgálatainkban a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) által létrehozott antifungális érzékenységi vizsgálati eljárásokat alkalmaztuk. Ezt a dokumentumot először 1992-ben adták ki, majd az évek során több módosításon ment keresztül, míg mostani formáját az M27-A3 változatban nyerte el (CLSI 2008a).

A kísérleteinkben is használt idő-ölés módszer elengedhetetlen kellék az antimikrobiális szerek aktivitásának megismerésében. Megfelelő információt nyújt a szer hatásának mértékéről, a farmakodinámiás tulajdonságairól (pl. a koncentráció, gyógyszer által kifejtett hatás és a posztantibiotikus effektus kapcsolata) és több gyógyszer együttes alkalmazása esetén megvizsgálható az esetleges antagonist, vagy szinergista hatás (Klepser és mtsai. 1998).

A szisztémás antifungális kemoterápia korszaka a Squibb laboratórium által kifejlesztett amphotericin-B (AMB) dezoxikolát bevezetésével kezdődött 1958-ban (Dutcher 1968). Habár ez a szer a súlyos gombás fertőzések kezelésében „gold-standard” lett több mint 40 évig, mégis az infúzió során tapasztalt mellékhatások és a dóziszfüggő vesekárosodás arra sarkallta a kutatókat, hogy kevésbé toxikus gyógyszereket fejlesszenek ki, amelyek orálisan adva jobban szívódnak fel, illetve intravénásan is adhatóak. Ezeknek a feltételeknek az 1990-ben bevezetett flukonazol (FLU) tett eleget (Lewis 2011).

A korai imidazolok (mikonazol, ketokonazol) és a FLU orálisan jól alkalmazhatóak és jól meghatározható farmakokinetikát mutatnak a különböző szervekben, beleértve a cerebrospinális folyadékot és az üvegtestet is. Emellett kisebb mértékű a gyógyszerek közti kölcsönhatás és a toxicitásuk is alacsony (Rex és mtsai. 1994). Ezért a FLU hamar széles körben használt antifungális szerré vált a nyálkahártyát, illetve a szisztémás fertőzést okozó gombafertőzések kezelésében, de egyes *Candida* fajokkal szemben hatástalan lehet (*C. glabrata*, *C. krusei*) (Lewis 2011).

Az eddigi kutatások egy újabb mérföldköve a gombák sejtfalszintézisét gátló echinocandinok bevezetése volt, melyek invazív candidiázis és aspergillózis esetében

biztonsággal és jó hatásfokkal használhatóak, emellett kedvező farmakokinetikai és farmakodinámiai tulajdonságokkal rendelkeznek (Maertens és mtsai. 2004, Pappas és mtsai. 2007, Reboli és mtsai. 2007).

Ezek a gyógyszerek amellett, hogy kevésbé toxikusak, Betts és munkatársainak (2009) vizsgálata alapján a normál dózis háromszorosa is jól alkalmazható terápia során. *In vitro* azonban bizonyos *Candida* fajok MIC feletti gyógyszerkoncentráción paradox növekedést (PG) mutatnak, aminek a klinikai fontossága a candidiázisban szenvedő betegek kezelésében egyelőre nem bizonyított. Mindenesetre figyelemreméltó tény, hogy *in vitro* a PG olyan gyógyszerkoncentráción is megjelenik, ami a humán szérumban is elérhető a hagyományos dozírozási stratégia mellett (Shields és mtsai. 2011b).

A gyógyszerek kombinációban való alkalmazásával számos előnyre tehetünk szert. Így például a fokozott hatékonyság, az alacsonyabb dózisoknak köszönhető csökkent toxicitás és mellékhatások, a ritkábban előforduló gyógyszer-rezisztens variánsok, és a szélesebb hatásspektrum mind-mind arra mutat, hogy egyes gyógyszerkombinációkkal nagyobb terápiás siker érhető el (Ganesan és mtsai. 2004). Ezért kísérleteinkben a caspofungint (CAS) nemcsak magában, hanem egy másik sejtalkomponenst gátló szerrel, a nikkomycin Z-vel (NIK) is vizsgáltuk.

2. Irodalmi áttekintés

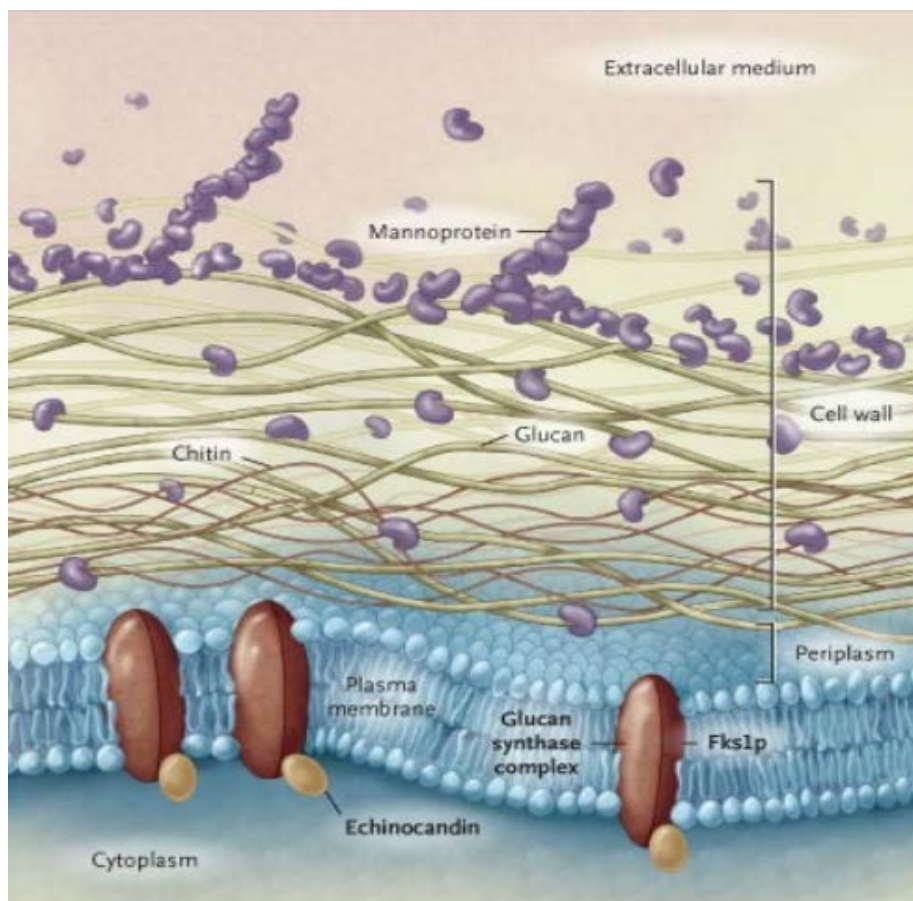
2.1. Gombák általános jellemzése

A gombák az eukarióták országába tartozó, 2-3 x 4-6 μm nagyságú, Gram-pozitívan festődő mikroorganizmusok (Gergely 2003). Heterotróf élőlények, aerob vagy anaerob életmódot folytatnak. Egyes *Candida* fajok (*C. albicans* és *C. dubliniensis*) csíratömlőt és chlamydospórákat is képeznek (Sanglard és mtsai. 2002). A chlamydospóra egy vastag falú sejt, ami a hifa végén leginkább tápanyagban szegény környezetben jön létre (Staib és mtsai. 2007).

Bizonyos *Candida* fajok hifa illetve pszeudohifa képzésére is képesek. Hifát csupán a *C. albicans*, a *C. tropicalis* és a *C. dubliniensis* hozhat létre, míg pszeudohifát az előbb felsorolt fajok mellett a *C. parapsilosis*, a *C. guilliermondii*, a *C. glabrata* és a *C. lusitaniae* fajok is fejleszthetnek (Delma és mtsai. 2011). A hifa sejtfala egymással párhuzamos lefutású, szélessége megegyezik a sejt minden pontján és a sejt végén valódi szeptummal kapcsolódik a következő sejthez. Ezzel szemben a pszeudohifa sejtjei ellipszis alakúak, nincsenek valódi szeptumaik. Fontos különbség, hogy csak a hifa rendelkezik Spitzenkörperrel, ami a hifacsúcs növekedését elősegítő speciális organelum. Attól függetlenül, hogy a pszeudohifa fizikálisan a hifához hasonlít, mégis sokkal több tulajdonságban egyezik meg a gombasejttel (Delma és mtsai. 2011).

Kivétel nélkül jellemző a gombákra, hogy valódi sejtfaluk van, melynek fő vázát a β -1-3-glükán, a kitin és poliszacharidok alkotják, melyek a sejtfal strukturális integritását és alakját tartják fenn (1. ábra). Emellett megtalálható még β -1-4-glükán, β -1-6-glükán, mannán vagy galaktomannán, valamint különböző glikoproteinek, melyek a sejt egyedi tulajdonságaiért felelősek (Gergely 2003). Nem elhanyagolható, hogy a sejtfal meg tudja tartani rigiditását és egyben a rugalmasságát is, miközben fokozódik a fal vastagsága, és morfológiai változáson megy keresztül a sejt (Sundstrom 2002).

A sejtfal kitűnő támadáspontja az antifungális szereknek, így például az echinocandinoknak, illetve a NIK-nek. Az előbbi a β -1-3-glükán-szintáz, az utóbbi pedig, a kitin szintáz gátlásáért felelős. A sejtmembránban található ergosterol szintén fontos targetje egyes gyógyszereknek (azolok, AMB) (Denning 2003, Hector 1993).



1. ábra. A gombák sejtfalszerkezete (Bennett 2006)

2.2. A *Candida* fajok patogenezise, virulencia faktoraik

A patogén mikroorganizmusok által termelt virulencia faktorok elengedhetetlenek a fertőzés kialakításában. Természetesen számos virulencia faktor létezik és ezek közül is több alapvető fontosságú. Ilyen például a 37°C-on és a fiziológiai pH-n való növekedési képesség (Gauwerky és mtsai. 2009).

Az újabb antimikrobiális szerek kifejlesztésénél - a mai, egyre gyakrabban felbukkanó multi-rezisztens organizmusok korszakában - már nem elegendő csak a patogén alapvető folyamatainak a gátlását alapul venni, hanem a virulenciáért felelős faktorokra is nagyobb figyelmet kell fordítani. (Gauwerky és mtsai. 2009).



2. ábra. Morfológia és virulencia változása *Candida* fajokban (Delma és mtsai. 2011)

Számos emberre patogén gombafaj képes morfológiai változásokon átmenni, ami bizonyos esetben a virulenciájukat is befolyásolja (Delma és mtsai. 2011). Ilyen tényező egyes patogén gombák hifa képzése (pl. *C. albicans*) (2. ábra). Ezzel képes behatolni az epiteliális sejtrétegbe, sejtekbe, károsíthatja az endotél sejteket, továbbá a makrofágok, illetve neutrofil granulociták lízisét is okozhatja. Ilyen hifa specifikus gén a HYR1 (Hyphally Regulated Gene 1), ami a neutrofilek ölésében játszik fontos szerepet (Luo és mtsai. 2010). Csak a hifára jellemző a tigmotropizmus (érintésre, mechanikai hatásra bekövetkező mozgás), amivel a szövetek közötti hézagokba képes behatolni (Gow és mtsai. 1994, Gow és mtsai. 2002, Kumamoto és mtsai. 2005).

Az immunrendszer hatásosabban védekezik a hifát nem képező *Candida* fajok ellen, az ezek által okozott letalitás *in vivo* állatmodellben szignifikánsan kisebbnek bizonyult (Romani és mtsai. 2003). A hifát képező fajok virulensebbek, melynek az az egyik magyarázata, hogy a hifák ölése sokkal lassabban következik be (Spellberg és mtsai. 2003).

A fenotípusváltásnak fontos szerepe van a gazdaszervezethez való adaptációban, mely során a fehérből opálos teleptípus átalakulás következik be. Felmerült az a feltételezés, hogy ez a jelenség is befolyásolhatja a patogenezis folyamatát (Kim és mtsai. 2011, Romani és mtsai. 2003).

A *Candida*-k patogenezisében fontos szerepet tölt be a biofilmképzés által kiváltott antifungális rezisztencia, ami a katéterhez társult véráram fertőzéseknél és egyéb orvosi

eszközökhöz társultan (pl. műbillentyű) jelenhet meg. Leggyakoribb biofilmképző gombák közé tartoznak a *C. tropicalis*, a *C. parapsilosis*, a *C. glabrata* és a *C. albicans* (Shin és mtsai. 2002).

Choi és munkatársai (2007) ezen négy faj által képzett biofilm esetén vizsgálták a különböző antifungális szereket. A letapadó, biofilmképző sejtek MIC₅₀ és MIC₈₀ értéke (az a gyógyszerkoncentráció, ahol az izolátumok 50, illetve 80 százalékának a növekedése gátolt volt) FLU-ra minden esetben >1024 mg/l volt, tehát a gyógyszer hatástalannak bizonyult. Az AMB mérsékelt aktivitást mutatott, habár MIC₈₀ értéke >32 mg/l volt, a MIC₅₀ pedig 1-2 mg/l között változott. *C. albicans* és *C. glabrata* ellen a CAS és a micafungin (MICA) hatásosnak bizonyult (MIC= 0,12-1 mg/l), míg *C. parapsilosis* és *C. tropicalis* esetében a MIC értékek >16 mg/l értéket vettek fel. Mukherjee és munkatársai (2004) biofilmképző *C. albicans* és *C. parapsilosis* izolátumok érzékenységét vizsgálták meg a legtöbb antifungális szerrel szemben. Megfelelő hatást csak az echinocandinok (MIC= 0,125-0,25 mg/l) és a lipid asszociált AMB-k (MIC= 0,25-1 mg/l) produkáltak.

A proteázok közül a Sap (szekretált aszpartil proteáz) hidrolitikus enzimek a *C. albicans* fő virulencia faktorai. Legfontosabb szerepük, hogy tápanyagot juttassanak a sejt számára, segítsék a penetrációt és az inváziót, illetve, hogy kitérjenek az immunválasz elől (Gauwerky és mtsai. 2009).

A Sap1, Sap2 és Sap3 közreműködik a szöveti károsodásban és segíti az inváziót a bőr epidermiszében és a száj epitéliumában. A Sap4, Sap5 és Sap6 enzimek a szisztémás fertőzésekben játszanak fontos szerepet és általában a sejt-hifa átalakulás alatt indukálódnak (Naglik és mtsai. 1999, Nantel és mtsai. 2002). A Sap9 és Sap10 fehérjék az adhézióban, a sejtek szétválásában és a felszíni integritás megtartásában jelentősek, míg a Sap7-ről és Sap8-ről alig tudunk ezidáig valamit (Albrecht és mtsai. 2006).

A szekretált foszfolipáz B a *Cryptococcus neoformans* makrofágokban való túlélésében, illetve a tüdő szöveti károsodásban játszik fontos szerepet. Továbbá *C. albicans* és *A. fumigatus* okozta fertőzésekben is kimutatták már szerepét (Birch és mtsai. 1996, Mirbod és mtsai. 1995). Kiemelhető a *C. albicans* foszfolipáz B1 fehérjéje, amely a gomba fertőzőképességéhez szükséges (Ghannoum 2000).

A calcineurin egy kalcium által regulált enzim, amely *C. albicans* virulenciájában, főként a szérumban való túlélésben fontos (Blankenship és mtsai. 2003). Emellett *C. neoformans*-ban a 37°C-on való túlélésért, invazív aspergillózis esetében pedig a csírázásért és a hifa növekedéséért felelős (Cramer és mtsai. 2008, Gauwerky és mtsai. 2009).

Az oxidatív stressz ellen is képesek megvédeni magukat a gombák. Erre jó példa a *C. albicans* SOD5 génje, ami a szuperoxid diszmutázt kódolja, ezáltal megvédve a toxikus gyökökkel szemben a gombát (Marthcenko és mtsai. 2004).

2.3. Epidemiológia

Már több, mint 200 *Candida* fajt sikerült leírni eddig, amiből csupán csak néhány érintett a humán fertőzésekben. A *Candida* fajok által okozott véráramfertőzések több mint 95%-át öt faj okozza: a *C. albicans*, a *C. glabrata*, a *C. tropicalis*, a *C. parapsilosis* és a *C. krusei* (Warnock 2007). A sarjadzó gombák, mivel a normál mikroflóra részei, ép immunrendszerűekben elvéve okoznak súlyos megbetegedéseket. Kis számban jelen vannak a hüvelyben, szájüregben, vastagbélben és a bőr felületén is (Nucci és mtsai. 2001).

Annak ellenére, hogy a *C. albicans* előfordulása az elmúlt években világszerte csökkent, még mindig a leggyakoribb kórokozója az invazív candidiázisoknak (66%). A *C. glabrata* és *C. krusei* fajok gyakorisága változatlan maradt, míg a *C. tropicalis*-é 4,6%-ról 7,5%-ra, a *C. parapsilosis*-é pedig 4,2%-ról 7,3%-ra növekedett az 1997 és 2003 közötti időszakban (Pfaller és mtsai. 2005b).

Trick és munkatársai (2002) tanulmányukban kiemelik, hogy a *C. glabrata* kétségtelenül az egyik legfontosabb opportunistá patogén az USA-ban, mivel az összes *Candida* fajt tekintve 20-24%-os előfordulásával a *C. albicans* után a második leggyakoribb candidémiát okozó faj. Szintén az USA-ban, hematopoietikus őssejt transzplantáltaknál a leggyakrabban leírt *Candida* faj volt a 2001-2006 közötti időszakban, amelyet a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* követett (Kontoyiannis és mtsai. 2010). Ezzel szemben Európában 8-10% körüli az előfordulásuk (Poikonen és mtsai. 2003, Richet és mtsai. 2002, Tortorano és mtsai. 2002), míg Latin-Amerikában a legalacsonyabb, csupán 4-7% (Pfaller és mtsai. 2007). Újszülöttekben és gyerekek körében ritka a *C. glabrata* által okozott szepszis, de ez idősebb korra szignifikánsan megemelkedik (Warnock 2007).

A *C. tropicalis* az egyik legfontosabb gombapatogén neutropéniás és hematológiai betegségekben (Kontoyiannis és mtsai. 2001, Marr és mtsai. 2000, Wingard és mtsai. 1995). Amíg Észak-Amerikában csupán a negyedik leggyakoribb szepszist okozó *Candida* faj (7%), addig Latin-Amerikában a második (20%) és az ázsiai területeken is sokkal gyakoribb, mint a *C. glabrata* (15-20%) (Pfaller és mtsai. 2007).

A *C. krusei* leggyakrabban vér és csontvelő transzplantáltakban és hematológiai betegségek esetén okoz candidémiát (Marr és mtsai. 2000, Wingard és mtsai. 1995). Az összes candidémiát okozó *Candida* faj 2-4%-át teszi ki, habár daganatos betegek körében gyakrabban diagnosztizálták Európában és az USA-ban (Marr és mtsai. 2000, Viscoli és mtsai. 1999). Horn és munkatársai (2009) tanulmányában a legmagasabb halálozási arányt a *C. krusei* mutatta (52,9%) candidémiás betegeknél, míg *C. parapsilosis*-nál ez az érték a legalacsonyabb volt (23,7%).

A *C. parapsilosis* előszeretettel képez biofilmet katétereken és egyéb implantált eszközökön, emellett fontos nozokomiális fertőzést okozó gombafaj is egyben (Pfaller és mtsai. 2007). Az elmúlt években megnövekedett az előfordulásuk, főleg Latin-Amerikában (Levin és mtsai. 1998). Európában is már gyakrabban izolálható, mint a *C. glabrata* (Warnock 2007), viszont a halálozási arányuk elmarad a többi *Candida* fajhoz képest (Pfaller és mtsai. 2007). Pappas és munkatársai (2003) tanulmányában a leggyakrabban leírt faj volt gyerekek körében, míg felnőttekben ritkán volt megtalálható.

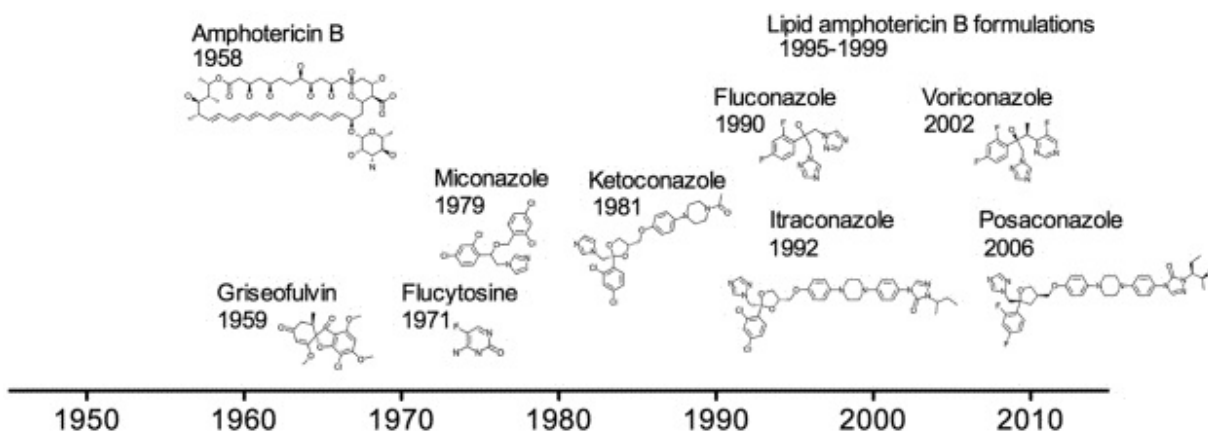
A *C. guilliermondii* a köröm gombás fertőzéséért és szuperficiális kolonizációért felelős (Pfaller és mtsai. 2007), de Kao és munkatársai (1999) kardiovaszkuláris vagy hasi műtetet követően kialakult candidémiában is leírták már. A *Candida* fajok közül ritkábban fordul elő, de Latin-Amerikában 3-5%-ot is elérheti a gyakoriságuk (Colombo és mtsai. 1999).

A *C. inconspicua* a HIV fertőzöttekben és a hematológiai betegségekben gyakori, mint fungémiát okozó gomba (Baily és mtsai. 1997, D'Antonio és mtsai. 1998).

2.4. Antifungális szerek

A gombák okozta fertőzések előfordulása és diverzitása jelentősen megnövekedett az utóbbi évtizedekben, amit az antifungális szerek fejlődése sem csökkentett szignifikánsan (3. ábra). Emellett az invazív gombás fertőzések esetén a mortalitás aránya még mindig

magas (40-80%) (Pfaller és mtsai. 2004a). A manapság használt antifungális szereket lokális, illetve szisztémás gombás betegségek esetében is lehet alkalmazni (Gauwerky és mtsai. 2009).



3. ábra. A szisztémás antifungális szerek megjelenésének időbeli eloszlása (Lewis 2011)

2.4.1. Polién típusú antifungális szerek

A poliének irreverzibilisen kötődnek az ergoszterolhoz, ami komplexet formálva beépül a sejtmembránba. Ez a komplex pórust hoz létre, ami az intracelluláris tartalom kiáramlását okozza (Lewis 2011).

Az első polién a nystatin volt, melyet csak felszíni *Candida* fertőzések kezelésére lehet alkalmazni (Gergely 2003). A csoport legismertebb és legszélesebb körben használt tagja az AMB. Egy, a talajban található *Streptomyces* faj fermentlevéből izolálták először.

Többféle AMB származék van forgalomban: hagyományos AMB (AMB dezoxikolat), lipid-asszociált AMB (AmBisome, Abelcet, Amphocil/Amphotec) (Dupont 2002).

Cantón és munkatársai (2004) vizsgálták a különböző *Candida* fajok érzékenységét AMB iránt idő-ölés görbék segítségével. Azt tapasztalták, hogy *C. albicans*, *C. dubliniensis* és *C. lusitaniae* esetén hamar fungicid hatás következett be már 2 mg/l koncentráción is, míg más fajoknál, pl. *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* esetében a hasonló koncentráción csak 48 óra elteltével, vagy még annál is később következett be az ölő hatás.

Az AMB-nek nagyobb az aviditása az ergoszterolban gazdag gombasejt membránjához, viszont magas koncentrációban való felhalmozódásakor a különböző szervezetben, így például a vesében, elvesztheti szelektív toxicitását és közvetlen károsodást képes okozni a koleszterolban gazdag emlőssejtek membránjában (Groll és mtsai. 1998). Ezért a nefrotoxicitás egy általános dózisfüggő mellékhatása az AMB-nek. Az antimikotikum mellékhatásai között szerepel még a hidegrázás, láz és a megfázásos tünetek (Cleary és mtsai. 2003).

Ezek a káros következmények ösztönözték a kutatókat a lipid-asszociált AMB készítmények alkalmazására (Dupont 2002, Pappas és mtsai. 2004). Ezen származékokból napi 5 mg/kg, vagy még nagyobb dózis is adható, habár a vérben mérhető szabad (vagyis fehérjéhez nem kötött) AMB szintje így sem több mint 1 mg/l, aminek a magyarázata az AMB plazmafehérjékhez való nagymértékű kötődésében rejlik (Lewis és mtsai. 2000).

2.4.2. Azol típusú antifungális szerek

Kémiaileg kétféle alapszerkezetű csoportjuk van. A régebbi szerek imidazol (ketokonazol, mikonazol, klotrimazol), míg az újabbak triazol alapvázal [FLU, itrakonazol (ITRA), vorikonazol (VOR)] rendelkeznek (Ghannoum és mtsai. 1999, Sheehan és mtsai. 1999). Az azoloknak, a poliénekhez hasonlóan az ergoszterol szintézis a támadáspontjuk. Hatásuk a citokróm P450 függő enzim, a 14 α -demetiláz gátlása révén valósul meg. Ezáltal a sejtmembránban ergoszterol hiány lép fel, ez károsítja a membrán fluiditását, és toxikus 14 α -metilált szterolok felhalmozódásához vezet, ami végül a sejtnövekedés megállását és a sejt pusztulását eredményezi (Sheehan és mtsai. 1999). Ez az enzimgátlás nem szelektív, ezért az antimikotikum a humán P-450 enzimekhez is kötődik, így a szterin szintézist és anyagcserét is befolyásolja (Spellberg és mtsai. 2006).

A FLU a leggyakrabban használt azol típusú szer, melyet *Candida* fajok, illetve *C. neoformans* által okozott fertőzések kezelésére alkalmazzák mind lokális, mind pedig szisztémás formában (Pappas és mtsai. 2004, Sheehan és mtsai. 1999). Nemcsak terápiás szerként adható, de profilaxisban is széleskörűen használják (Pappas és mtsai. 2004).

Ostrosky-Zeichner és munkatársai (2003) alacsony FLU MIC₉₀ értékeket (0,5-2 mg/l) figyeltek meg *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* és *C. dubliniensis* esetében. Ezzel megegyező eredményt hozott Mikamo és munkatársai (2000) által elvégzett vizsgálat, akik

azt találták, hogy *C. parapsilosis* ellen a FLU már alacsony (0.125-4 mg/l) koncentrációkon is fungicid hatást fejt ki.

2.4.3. 5-fluorocitozin

Ezt az antimikotikumot két gombaszpecifikus enzim képes felvenni, a citozin permeáz és a citozin deamináz, amelyek ezután citosztatikus 5-fluorouracillá alakítják át. A gombasejtben a gyógyszer aktív formája a timidilát szintáz gátolja, ezáltal hibás RNS kódolást okoz (Diasio és mtsai. 1978, Groll és mtsai. 1998). Mivel a bélflóra baktériumai is képesek felvenni a gyógyszert, ezért mellékhatásai között gyakran szerepel a hányinger, hányás és a hasmenés (Groll és mtsai. 1998).

A szer ölü hatása faj-, illetve törzsfüggő. Lewis és munkatársai (2000) fungisztatikusnak találták több *Candida* species esetében is (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*), míg más tanulmányokban az 5-fluorocitozin fungicid hatását figyelték meg *C. lusitaniae* és *C. inconspicua* törzsek ellen (Ernst és mtsai. 2002b, Majoros és mtsai. 2005).

Elsődlegesen élesztőgombák ellen hatásos. Monoterápiás szerként adagolva gyorsan fejlődik ki vele szemben másodlagos rezisztencia, ezért általában valamilyen más antifungális szerrel kombinálva szokták javasolni (Vermes és mtsai. 2000).

2.4.4. Echinocandinok

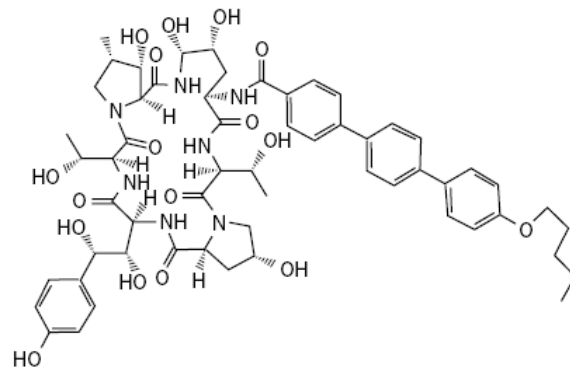
2.4.4.1. Farmakológiai tulajdonságok

Az echinocandinok olyan szemiszintetikus lipopeptidek, melyek bizonyos gombák természetes termékének kémiaiilag módosított változatai (4. ábra). Molekulatömegük megközelítőleg 1200 kDa. A CAS-t a *Glarea lozoyensis* pneumocandin B-ből, az anidulafungint (ANI) az *A. nidulans* echinocandin B₀-ből és a MICA-t a *Coleophoma empedri* egyik hexapeptidjéből állítják elő. Antifungális aktivitásukat a ciklikus hexapeptidek N-kapcsolt acil zsírsav oldalláncának elhelyezkedése és konformációja határozza meg (Chen és mtsai. 2011).

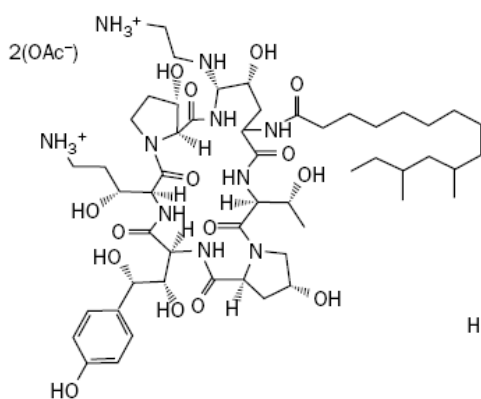
Az echinocandinok az 1,3-β-D glükán szintáz nemkompetitív gátlása révén fejtik ki hatásukat, ami a gomba sejtfa fő glükán komponensét, az 1,3-β-D glükán bioszintézisét végzi. A gyógyszer megváltoztatja a sejtfa integritását, csökken a vastagsága, így az

elvezíti mechanikai szilárdságát, a sejt nem képes ellenállni az intracelluláris ozmotikus nyomásnak és ez végül a sejt líziséhez vezet (Bennett 2006). Ez az enzimkomplex két alegységgel rendelkezik: Fksp és Rho1p. Az Fksp az echinocandinok támadáspontja. Ez az alegység 3 gén által kódolt, az FKS1, FKS2 és FKS3. A gombafajok gyógyszerrel szembeni rezisztencia kialakulása ezen alegységek bizonyos aminosavcseréjének köszönhetően jön létre (Garcia-Effron és mtsai. 2011). Mivel az emlőssejtek nem rendelkeznek ezzel az enzimmal, ezért ez a gyógyszercsoport szelektív toxicitással rendelkezik a gombasejtekre, ezzel is hozzájárulva a biztonságosabb használatukhoz (Glöckner és mtsai. 2008).

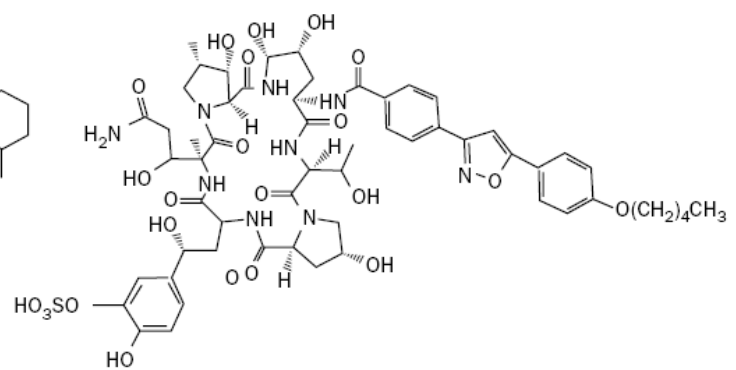
Anidulafungin



Caspofungin



Micafungin



4. ábra. Az echinocandinok szerkezeti képlete (Denning 2003)

2.4.4.2. Az echinocandinok hatásspektruma

Az echinocandinok széles hatásspektrummal rendelkeznek a *Candida* és *Aspergillus* fajok körében, míg *Zygomycetes*-ek és *C. neoformans* ellen hatástalanok, mivel a sejtfaluk 1,3- α és 1,6- α glükánt tartalmaz. Mindhárom echinocandin *in vitro* és *in vivo* is fungicid a *Candida* fajok nagy részével szemben, beleértve az azol rezisztenseket (*C. krusei*, *C. glabrata*) és az AMB rezisztenseket (*C. lusitaniae*) is (Bal 2010, Chen és mtsai. 2011).

Mivel néhány *Candida* faj (*C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*) echinocandinokra intrinzik rezisztenciát mutat, ezért a régebbi, összes *Candida* fajt magába foglaló érzékenységi határérték helyett (≤ 2 mg/l) az elmúlt évben Pfaller és munkatársai (2011b) új, fajspecifikus 'breakpoint'-okat határoztak meg (1. táblázat).

1. táblázat: Faj-specifikus echinocandin érzékenységi kategóriák (Pfaller és mtsai. 2011)

Antifungális szer	<i>Candida</i> faj	MIC (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

A CAS *in vitro* hatásosnak bizonyult ($MIC_{90} = 0,03-0,06$ mg/l) *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* és *C. pellucilosa* ellen, míg *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* ($MIC_{90} = 0,5$ mg/l) és *C. guilliermondii* ($MIC_{90} = 1$ mg/l) ellen gyengébb aktivitást mutatott (Pfaller és mtsai. 2006a, Pfaller és mtsai. 2008).

A MICA hasonlóan hatásos volt ($MIC_{90} = 0,015$ mg/l - 0,12 mg/l) a legtöbb *Candida* fajjal szemben, egyedül *C. parapsilosis* ($MIC_{90} = 2$ mg/l) és *C. guilliermondii* ($MIC_{90} = 1$ mg/l) mutatott magasabb MIC értékeket (Chandrasekar és mtsai. 2011, Pfaller és mtsai. 2008), de ezek is a módosított érzékenységi határértéken belül maradtak.

Az ANI MIC_{90} értékei 0,03-0,25 mg/l között változtak, kivéve *C. parapsilosis* esetében, ahol 2 mg/l volt megfigyelhető (Ostrosky-Zeichner és mtsai. 2003). Pfaller és munkatársai (2008) kísérletében a MIC_{90} értékek szűkebb tartományban mozogtak (0,06-0,12 mg/l), míg *C. parapsilosis* és *C. guilliermondii* MIC értéke megegyezően 2 mg/l volt.

A 'psilosis-csoport' tagjai közül a *C. parapsilosis* bizonyult a legkevésbé érzékenynek az echinocandinokra (CAS MIC értéke 2 mg/l, MICA MIC értéke 0,5 mg/l). A *C. orthopsilosis* MIC értékei 0,5-0,25 mg/l között változtak CAS és MICA esetében, míg *C. metapsilosis*-nál tapasztalták a legalacsonyabb MIC értékeket (0,25 mg/l mindkét echinocandin jelenlétében) (Cantón és mtsai. 2010). Spreghini és munkatársai (2012) kísérletében alacsonyabb MIC értékeket figyeltek meg Cantónéval összehasonlítva, viszont ugyanúgy a *C. parapsilosis* bizonyult a legkevésbé érzékenynek echinocandinok iránt, míg *C. metapsilosis* mutatta a legalacsonyabb MIC értékeket.

Az *in vitro* kísérletek alapján összefoglalva elmondható, hogy a leghatásosabb gyógyszer az összes *Candida* fajt tekintve a CAS volt ($MIC_{90} = 0,25$ mg/l), ezt követte a MICA ($MIC_{90} = 1$ mg/l), majd az ANI ($MIC_{90} = 2$ mg/l) (Pfaller és mtsai. 2008).

2.4.4.3. Farmakokinetikai tulajdonságok

Az echinocandinokra jellemző, hogy *per os* adva rosszul szívódnak fel, a szérumban pedig, nagymértékben kötődnek szérumfehérjékhez (96-99,8%). Tüdőben, májban és a lépben halmozódnak fel magasabb koncentrációban, de gyenge a penetrációs képességük a központi idegrendszerbe és a szembe a fehérjekötődésük és a molekulaméretük miatt. Az

echinocandinok nem dializálhatóak és a vese működésének zavara esetén nem szükséges a dózis csökkentése (Denning 2003).

Mindhárom gyógyszerre jellemző az intravénás kezelés után a dóziszfüggő lineáris farmakokinetika. A CAS és a MICA maximális csúcskoncentrációja (C_{max}) körülbelül 10 mg/l, a görbe alatti terület értéke pedig, megközelítőleg 110 mg*h/l (Pfaller és mtsai. 2011b). A CAS és a MICA a májban bomlik le enzimatis N-acetiláció, hidrolízis és kisebb mértékben a citokróm P450 izoenzimek által, valamint spontán degradáció útján inaktív metabolitokká. Ezért dóziscsökkentés javasolt azoknál a betegeknél, akik súlyos májelégtelenségben szenvednek (Denning 2003). Az ANI csaknem teljes mértékben lassú kémiai átalakulás során bomlik le az epében. Összehasonlítva a CAS-nal és a MICA-nal, az ANI-nak alacsonyabb a C_{max} értéke, de sokkal hosszabb a felezési ideje plazmában és a szövetekbeli eloszlása is nagyobb mértékű (Denning 2003, Glöckner és mtsai. 2008).

2.4.4.4. Farmakodinámiai tulajdonságok

A *Candida* fajok ellen az echinocandinok koncentrációfüggő, fungicid aktivitással rendelkeznek (Chen és mtsai. 2011). *In vivo* farmakodinámiai adatok szerint az echinocandinok által kiváltott ölés szoros összefüggésben van a C_{max}/MIC (a csúcskoncentráció aránya a MIC értékhez viszonyítva) illetve az AUC/MIC (a görbe alatti terület és a MIC aránya) értékekkel. Ezáltal ugyanazt a terápiás hatást tudjuk elérni az egyszeri, nagy dózisú echinocandin terápiával, mint a kisebb, naponta adott terápiával (Spellberg és mtsai. 2006). Louie és munkatársai (2005) is a heti egyszer adott, vagy a két részre osztott dozírozási stratégiát ajánlják echinocandinok esetében. Ezt *in vivo* egérkísérletekben támasztották alá, ahol a vesében kitenyészett gombatelepek száma az egyszeri dózisonál volt a legkisebb, míg a négy részre osztottnál a legmagasabb, habár szignifikáns különbséget nem figyeltek meg.

In vivo dózistól függően az echinocandinok hosszú (akár 96 órás szaporodás gátlás) posztantifungális hatást (PAFE) mutatnak a kontroll állatokhoz képest. Azon gyógyszereknek, amelyeknek az *in vivo* hatékonyságát a C_{max}/MIC vagy az AUC/MIC paraméterekkel lehet jellemezni, általában hosszú a PAFE értékük (Spellberg és mtsai. 2006).

2.4.4.5. Klinikai hatékonyság, tanulmányok

Az FDA (Food and Drug Administration / Amerikai Gyógyszerellenőrző és Engedélyező Hatóság) a CAS-t jóváhagyta lázas neutropénia empirikus terápiájában, candidémia és az invazív candidiázis különböző formáinak kezelésében, illetve oesophageális candidiázisban és invazív aspergillózisban szenvedő betegeknél is. A MICA és az ANI candidémia, invazív candidiázis és oesophageális candidiázis kezelésére engedélyezett. A MICA továbbá használható őssejt-transzplantáltak *Candida* fertőzéseinek megelőzésében (Chen és mtsai. 2011).

A CAS-nál az elfogadott dozírozási stratégia a 70 mg telítő dózis után adott napi 50 mg, ami a szervezetben egy állandó, >1 mg/l gyógyszerkoncentrációt tart fenn (Dodds és mtsai. 2006). Ettől eltérő kezelést csak súlyos májelégtelenségben szenvedőknél (70 mg telítő dózis után 35 mg napi dózis) és oesophageális candidiázis esetében (50 mg napi dózis) alkalmaznak (Chen és mtsai. 2011).

A MICA elfogadott intravénás adagolása a napi 100 mg dózis, ez oesophageális candidiázis esetén 150 mg, míg őssejt-transzplantáltak profilaxisában 50 mg/nap-ra változik. ANI esetében a 200 mg telítő dózis után adott 100 mg/nap a jóváhagyott dozírozási stratégia, felére csökkentve csak oesophageális candidiázisban szenvedő betegeknél használják (Chen és mtsai. 2011).

de Wet és munkatársai (2004) oesophageális candidiázisban szenvedő HIV-pozitív betegeknél vizsgálták a különböző koncentrációjú MICA (50, 100, 150 mg/nap) hatását. Szignifikáns különbség mutatkozott a gyógyulásban a két szélső dózisérték között (68% és 89% gyógyulási arány), míg a mellékhatásokban nem tapasztaltak jelentős különbséget. Ezt az eredményt korábbi vizsgálatok is megerősítették (Pettengell és mtsai. 2004), ahol szintén a nagyobb MICA dózis (50-100 mg/nap) hatásosabbnak bizonyult a 12,5-25 mg/nap dózistól.

Egy másik vizsgálatban a CAS és a MICA kezelés hatásosságát vizsgálták meg (Pappas és mtsai. 2007). Eredményeik alapján a kezelés sikeressége a 100 mg/nap MICA esetében volt a legjobb, a standard CAS dózissal (70 mg telítő dózis után 50 mg/nap) és a 150 mg/nap MICA-nal összehasonlítva, habár az eredmények között az eltérések statisztikailag nem voltak szignifikánsak.

A lipid asszociált AMB és az echinocandinok klinikai hatásosságát többször is összehasonlították már. Mora-Duarte és munkatársai (2002) kísérletében a CAS és az AMB hasonló aktivitást mutatott, viszont a mellékhatásokat tekintve az előbbi gyógyszernél jelentősen jobb eredményt figyelhettünk meg. Oesophagitis-es betegek körében a kezelés sikeressége szignifikánsan magasabb volt a napi 50 mg/kg és a 70 mg/kg CAS esetén (74% és 89%), mint 0,5 mg/kg/nap dózisú AMB-nél (63%) (Villanueva és mtsai. 2001). Invazív candidiázis kezelésében a napi 100 mg MICA hasonló terápiás sikerességet ért el (74,1%), mint a 3 mg/kg/nap lipid asszociált AMB (69,6%), viszont a mellékhatások az utóbbi gyógyszer esetében sokkal gyakrabban fordultak elő és a terápia megszakítására is többször került sor (Kuse és mtsai. 2007).

2.4.4.6. Humán szérum

Az echinocandinokra jellemző, hogy magas fehérjekötő képességgel rendelkeznek humán szérumban. Ez az érték CAS-nál a legalacsonyabb (96,5%), ezt követi az ANI 98-99%-kal és a MICA 99,8%-kal. Ezen tulajdonság ismeretében azt feltételezik, hogy a szérum fehérjéinek *in vitro* szérumos kísérletekben és *in vivo* is szerepe lehet az antimikrobiális szerek hatásának megváltoztatásában (Odabasi és mtsai. 2007). A CAS és az ANI elsődlegesen az albuminhoz, míg a MICA az albuminhoz és az α -1 savas glikoproteinhez kötődik (Paderu és mtsai. 2007).

Több *in vitro* tanulmányban is rávilágítottak arra a tényre, hogy az 50%-os humán szérum alkalmazásával a MIC értékek megnövekednek az RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) tápközegben tapasztaltnál képest (Garcia-Effron és mtsai. 2011, Odabasi és mtsai. 2007, Paderu és mtsai. 2007). Ez az arány ANI és MICA esetében nagyobb, mint CAS-nál, de megfigyeltek már változatlan MIC értéket is humán szérum jelenlétében CAS-nal végzett kísérletben (Paderu és mtsai. 2007).

Az RPMI-1640 tápközegben mért echinocandin MIC értékek közötti különbségek 50% szérum alkalmazásával eltűnnek, és hasonló MIC értékeket produkálnak, melyet *in vivo* állatkísérletben is bizonyítottak (Paderu és mtsai. 2007). Ezt alátámasztja Wiederhold és munkatársainak (2007b) vizsgálata, akik *C. glabrata* érzékenységét vizsgálták ANI-nal és CAS-nal szemben. *In vitro* az ANI hatásosabb volt, de egérkísérletek során a CAS legalább olyan jól csökkentette a veséből kitenyésztett gombatelepek számát magasabb

gyógyszerkoncentráción (5 és 10 mg/kg/nap), mint az ANI, sőt alacsonyabb koncentráción (0,5 és 1 mg/kg/nap) hatásosabbnak is bizonyult.

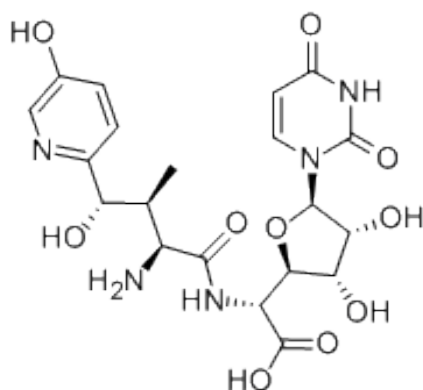
A MICA és az ANI nagyobb MIC eltérésében valószínű másodlagos faktorok is szerepet játszanak, mint például a gyógyszer transzportja a sejtekbe. Szérum nélküli közegben a gyógyszer fokozott antifungális hatása a jobb penetrációs képességre utal, ami valószínű az erősen hidrofób oldalláncoknak köszönhető (Paderu és mtsai. 2007).

Az echinocandinok csökkent aktivitása szérum jelenlétében arra enged következtetni, hogy a fehérje kötési tulajdonságuknak közvetlen hatása van a gyógyszerre, ami valószínű abban nyilvánul meg, hogy megváltoztatják a glükán szintáz gátlási képességüket (Paderu és mtsai. 2007).

A szabad gyógyszer hipotézis szerint szérum jelenlétében csupán az ANI 1%-a, a CAS 3,5%-a és a MICA 0,2%-a farmakológiailag aktív. Ennek értelmében a MIC értékeknek 200-500-szorosára kellene emelkednie. De ez nem egyezik meg a fentebb említett kísérletekben kapott eredményekkel. Ezért valószínűnek tartják, hogy a fehérjéhez kötött gyógyszer egy részének megmarad az antifungális aktivitása (Garcia-Effron és mtsai. 2011). Ishikawa és munkatársai (2009) ezt a hipotézist MICA esetében megcáfolták, mivel szerintük a gyógyszer köti a szérum fehérjéket, de ez a kötés reverzibilis és gyenge.

2.4.5. Nikkomycin Z

A NIK (5. ábra) a kitin szintáz szubsztrátjának, az UDP-N-acetilglükózaminnak kompetitív analógjaként gátolja a kitinszintézist (Sandovsky-Losica és mtsai. 2008.). A sejtek alakja megváltozik és lizálnak tűnnek, ami az ozmostabilitásért felelős kitin hiánya miatt következik be (Kim és mtsai. 2002). A NIK-t a *Streptomyces tendae* tenyészet felülúszójából izolálták először (McCarthy és mtsai. 1985).



5. ábra. A Nikkomycin Z szerkezeti képlete
(http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB0767000.htm)

A kitin szintáz (Chs) számos gombafajban megtalálható izoenzimként. Három izoformáját azonosították *Saccharomyces cerevisiae*-ben. A ScChs1 a citokinézis utáni helyreállító mechanizmusban, a ScChs2 a szeptum formálásban, a ScChs3 pedig a sejtfa kitin szintézisében és a kitin gyűrű formálásában vesz részt. A Chs három izoformája a *C. albicans*-ban szintén megtalálható, és az újabb kutatásoknak köszönhetően egy új kitin szintáz enzimet is találtak, a Chs8-at, ami a Chs2-vel együtt felelős a magas koncentrációjú echinocandin után kialakult stresszválasz-reakcióért (Walker és mtsai. 2008). Az aminosav sorrend szekvenciahomológiája alapján a CaChs1 a ScChs2-nek, a CaChs2 a ScChs1-nek, valamint a CaChs3 a ScChs3-nak felel meg (Kim és mtsai. 2002). A CaChs3 a sejtfa szintézisben játszik szerepet. Mivel a CaChs1 Δ /CaChs1 Δ mutánst nem lehet előállítani, ellentétben a ScChs2 Δ /ScChs2 Δ mutánsal *S.cerevisiae*-nél, feltételezhető, hogy a CaChs1 egy esszenciális gén a sejt növekedésben. Más vizsgálatok szerint a CaChs1 a szeptum formáláshoz és a sejtintegritáshoz szükséges (Munro és mtsai. 2001).

A NIK majdnem teljesen képes gátolni a ScChs1 és ScChs3 aktivitását, de a ScChs2-ét nem. A *C. albicans* esetében azonban mindhárom CaChs izoenzimet gátolja. A különböző kitin szintáz izoenzimre eltérően hat: a CaChs1 aktivitását jelentős mértékben gátolja a ScChs2-vel ellentétben, a CaChs2 aktivitását ugyanolyan mértékben gátolja, mint a ScChs1-nél, a CaChs3 aktivitását pedig, kevésbé csökkenti a ScChs3-nál. Ebből arra következtethetünk, hogy a NIK CaChs izoenzim gátlása fajspecifikus (Kim és mtsai. 2001).

A NIK *in vitro* képes gátolni a *C. albicans* sejtek kitinszintézisét mindkét morfológiai formában. Ezek a formák különböző mértékben expresszált kitin szintáz géneket tartalmaznak. A szer *in vivo* is gátolta a patogén stádiumban lévő sejtek növekedését egerek hasüreg- és vesefertőzése esetében (Chapman és mtsai. 1992).

A NIK különféle antifungális szerekkel kombinálva szinergismust mutathat. Így például NIK és az ANI kombinálásakor *A. fumigatus*, *Coccidioides immitis*, *Rhizopus* fajok és *C. albicans* esetén, valamint a NIK és CAS, illetve NIK és MICA kombinálásakor *A. fumigatus*-szal végzett kísérletek során (Chiou és mtsai. 2000, Ganesan és mtsai. 2004, Hector 1993).

Egy másik kísérletben a NIK + ITRA kombinációt alkalmazva szintén szinergizmust figyeltek meg *A. fumigatus*-szal és *A. flavus*-szal szemben, valamint *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. neoformans*, *C. immitis* tesztelésekor is szinergista kölcsönhatásról számoltak be a NIK + FLU valamint a NIK + ITRA kombinálása után (Li és mtsai. 1999).

Ezzel szemben, amikor *A. fumigatus* és *A. flavus* ellen poliéneket és triazolokat (FLU, VOR stb.) kombináltak NIK-vel, nem tapasztaltak jobb ölühatást (Ganesan és mtsai. 2004). Ezzel összhangban van Sandovsky-Losica és munkatársai (2008) kísérleti eredménye, miszerint az AMB és a NIK kombinációjával szinergizmus nem fordult elő.

A NIK-vel több prelinkai tanulmányt végeztek, jelenleg is klinikai vizsgálat alatt áll. A NIK-re jellemző, hogy szelektív toxicitása, mivel az emlőssejtek nem rendelkeznek kitinszintetázokkal. Emellett toxikus mellékhatásait sem figyelték meg a gyógyszernek egészséges felnőttekben *per os* adva, egyszeri 2000 mg dózis esetén, habár a biológiai hasznosulása kisebb mértékű, mint az alacsonyabb (1000-1500 mg) dózisoké. A gyógyszer felezési ideje 2-2,5 óra, ezért mindenképpen szükséges a 8-12 óránkénti adagolása (Nix és mtsai. 2009).

2.4.6. *Candida* fajok antifungális szerekkel szembeni rezisztenciái

Habár a *Candida* fajok érzékenysége AMB-vel szemben nagyon csekély az időbeli és földrajzi különbségeket tekintve, a *C. glabrata* és *C. krusei* fajok esetében magasabb MIC₉₀ értékeket figyelhetünk meg, mint *C. albicans*-nál (Cantón és mtsai. 2004, Krogh-Madsen és mtsai. 2006, Yang és mtsai. 2005). Emellett az ölési hatás is jelentősen később

következik be ennél a két fajnál (Pfaller és mtsai. 2007). *C. albicans* esetében különösen ritka a rezisztencia előfordulása, mégis Nolte és munkatársai (1997) izoláltak egy ergosterol deficiens törzset két, leukémiás beteg véréből is, amelyek mind FLU-ra, mind pedig, AMB-re rezisztensek voltak.

Bár közismerten a *C. lusitaniae* klinikailag rezisztens AMB-re, mégis a vérből való első izolálásukkor még érzékenyek a gyógyszerre, ezért úgy tűnik, hogy a terápia során a gomba másodlagos rezisztenciát alakít ki (Yoon és mtsai. 1999). McClenny és munkatársai (2002) azt figyelték meg, hogy két eltérő színű, vérből izolált *C. lusitaniae* telep nőtt ki CHROMagar Candida-n. A kék színű telepek érzékenyek voltak AMB-re, míg a lilák rezisztensek. Rezisztens telepeket csak emelt dózisú gyógyszeres terápia után mutattak ki, ami kiemeli a hosszantartó *C. lusitaniae* fertőzéseknél az AMB-vel szembeni folyamatos érzékenységi vizsgálatot.

Pfaller és munkatársai (2006b) 13338 vérből izolált *Candida* törzs érzékenységét vizsgálták meg FLU-ra. Kevesebb, mint 3%-uk mutatott rezisztenciát (MIC \geq 64mg/l), kivéve *C. glabrata* és *C. krusei* fajokat, melyek 9%-ban, illetve 40%-ban volt rezisztensek FLU-ra. Hasonló értékeket mutat az 1997 és 2003 közötti adatokból készült összehasonlítás is (Pfaller és mtsai. 2005b). *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* és *C. kefyr* esetében, a különböző fajok izolátumai közül 0-7% mutatott FLU rezisztenciát az egyes években, míg magasabb százalékos arányok voltak megfigyelhetőek *C. glabrata* (14-23%), *C. guilliermondii* (6-26%), *C. rugosa* (14-66%), *C. famata* (9-48%) és *C. krusei* (56-81%) fajok esetében.

A *C. glabrata* izolátumok rendelkezhetnek intrinzik, vagy másodlagosan kialakult rezisztenciával is, ami főleg a CDR (Candida Drug Resistance) efflux pumpák génexpressziójának fokozódása miatt következik be. Emellett keresztrezisztencia is jól megfigyelhető a FLU és a széles spektrumú triazolok (VOR, ITRA) között (Pfaller és mtsai. 2007).

A FLU rezisztens *C. rugosa* izolátumok előfordulása 30%-os növekedést mutatott 2001 és 2003 között, emellett pedig a VOR iránt csökkent érzékenységgel rendelkező izolátumok aránya is hasonló növekedést mutatott (Pfaller és mtsai. 2005b).

A *C. krusei* intrinzik rezisztenciával rendelkezik FLU iránt, viszont keresztrezisztencia ritkán figyelhető meg, mivel a VOR sokkal hatékonyabban köti a citokróom P450 izoenzimet, mint a FLU (Fukuoka és mtsai. 2003, Pfaller és mtsai. 2006b).

Echinocandinokkal szembeni rezisztencia kialakulhat (1) az FKS gének specifikus mutációjával, amelyek a glükán szintáz esszenciális alkotórészeit kódolják, (2) az Sbe2 Golgi fehérje overexpressziójával, ami a sejtalkomponensek transzportjában játszik fontos szerepet, (3) illetve a CDR és MDR efflux pumpák szabályozásával. Ezen mechanizmusok közül csupán az FKS mutációnak van klinikai jelentősége (Bachman és mtsai. 2002, Balashov és mtsai. 2006).

Az echinocandinok kitűnő aktivitást mutatnak a leggyakrabban előforduló *Candida* fajokkal szemben (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*), míg 10-100-szoros MIC érték növekedést (1-4 mg/l) figyelhetünk meg *C. parapsilosis* és *C. guilliermondii* esetében (Ostrosky-Zeichner és mtsai. 2003, Pfaller és mtsai. 2006a, Pfaller és mtsai. 2007). E két faj intrinzik rezisztenciája az FKS1-ben, a 'hot-spot 1 és 2' (HS1 és HS2) régiókban bekövetkező aminosav polimorfizmus eredménye (Chen és mtsai. 2011). Mégis a klinikai adatok hasonló terápiás sikerességet mutatnak más *Candida* fajokhoz viszonyítva, ami valószínűleg a két faj csökkent virulenciájának köszönhető (Arendrup és mtsai. 2011, Horn és mtsai. 2009).

FKS1 mutáció *C. albicans*-nál és a nem-*albicans Candida* fajok széles körében elterjedt (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*), ahol két régióban történhet változás: a HS1 641-649-es és a HS2 1345-1365 aminosavainál. Leggyakrabban a 645-ös pozícióban levő szerin cserélődik ki prolinra (S645P), fenilalaninra (S645F) vagy tirozinra (S645Y). (Chen és mtsai. 2011, Walker és mtsai. 2008). Ezek a mutációk okozzák a legnagyobb MIC érték növekedést, míg a más pozícióban levő aminosavak cseréjének kisebb mértékű az *in vitro* érzékenységi hatása (Garcia-Effron és mtsai. 2009).

CAS-nal szemben kialakult rezisztenciát már több alkalommal leírtak, és minden esetben további antifungális szerek, leggyakrabban azolok elleni rezisztenciát is megfigyeltek. Moudgal és munkatársai (2005) endocarditis-es betegből mutattak ki *C. parapsilosis*-t, ami mind echinocandinokra, mind pedig, azolokra rezisztens volt. Emellett megfigyeltek már candidémiát okozó, CAS-ra, AMB-re és azolokra rezisztens *C. glabrata*-t (Kroggh-Madsen

és mtsai. 2006), illetve oesophagitis-es beteg multiechinocandin és multiazol rezisztens *C. albicans* izolátumokat is (Laverdiere és mtsai. 2006).

Echinocandinokkal szemben rezisztenciát mutató *Candida* fajok MIC értéke mindig >2 mg/l, de általában meghaladja a 8 mg/l-t is, amely az echinocandinokkal való terápia hatástalanságát eredményezheti (Hernandez és mtsai. 2004, Katiyar és mtsai. 2006, Krogh-Madsen és mtsai. 2006).

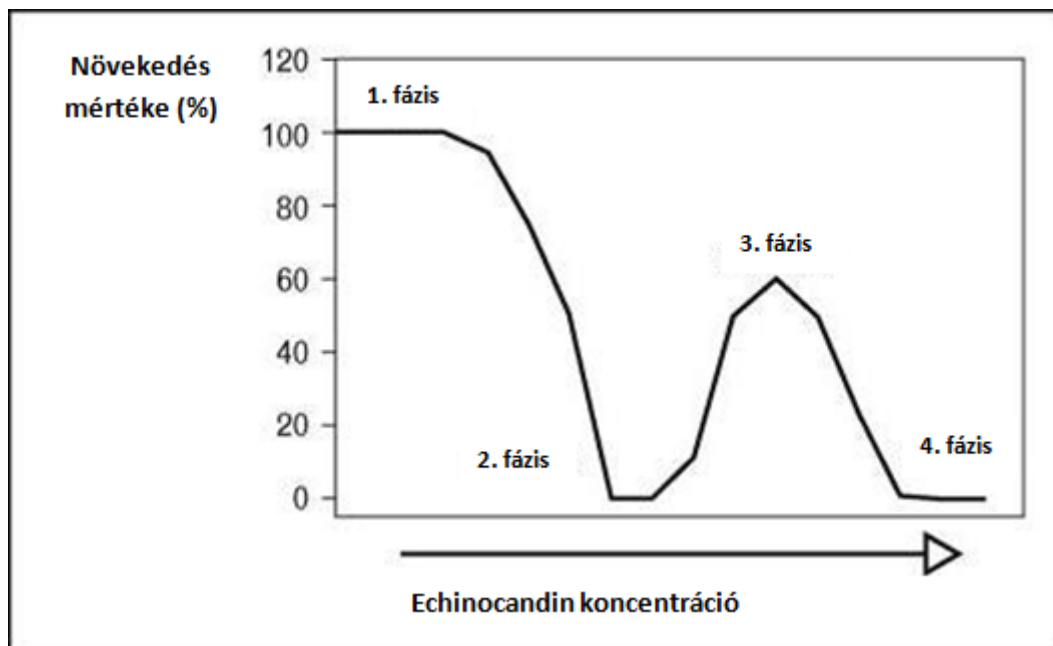
2.5. Paradox növekedés

In vitro kísérletekben gyakran megfigyelhető jelenség, hogy nagyobb koncentrációjú echinocandinok adagolását követően csökken a gyógyszer aktivitása az adott kórokozóval szemben. Némely esetben az echinocandinok kifejtik ölü hatásukat alacsony koncentrációnál, viszont magasabb koncentráció értéknél közel ugyanolyan növekedést mutatnak, mint a kontroll mintáknál. Ezt nevezik PG-nek, melyet az antifungális szerek közül kizárólag az echinocandinoknál figyeltek meg (Chamilos és mtsai. 2007).

Ezt a jelenséget először Eagle és Musselman írta le 1948-ban antibakteriális szereknél (Eagle-effektus) (Eagle és mtsai. 1948). Gombaellenes szereknél először Hall és munkatársai (1988) figyeltek meg PG-t. Kísérletükben néhány *C. albicans* és *C. tropicalis* magas cilofungin (echinocandin) koncentráción hasonló növekedést mutatott, mint a kontroll izolátum.

A jelenség 4 fázisú folyamat (Wiederhold 2007a) (6. ábra):

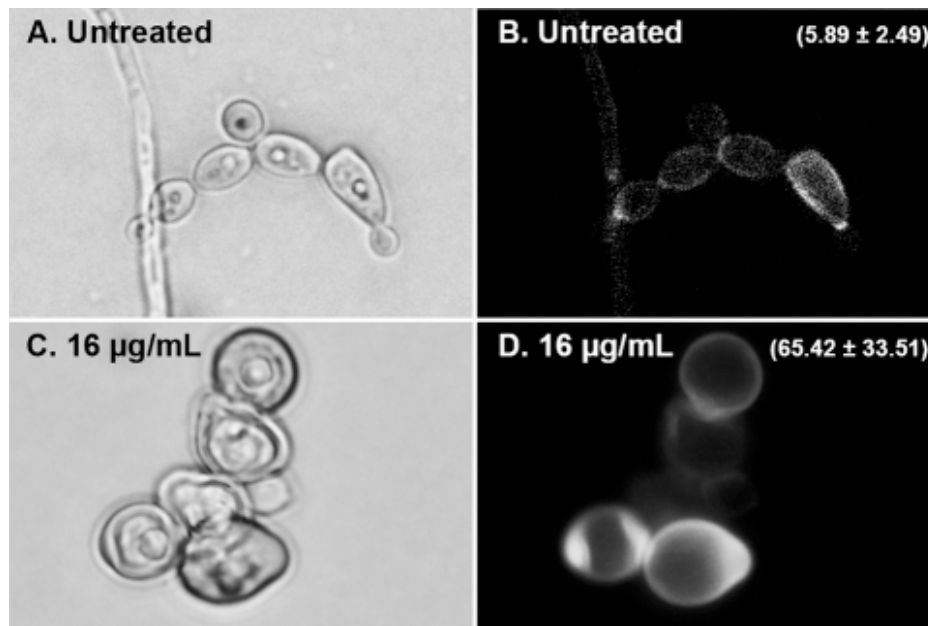
1. MIC érték alatti növekedés,
2. MIC érték feletti növekedésgátlás,
3. magasabb koncentráción gátlásmegszűnés,
4. teljes növekedésgátlás.



6. ábra. A paradox növekedés szakaszai (Wiederhold 2007a)

PG során a sejt morfológiai és biokémiai változásokon megy keresztül. A kísérletek jelentős csökkenést (2,7-7,8-szoros) mutattak a sejtfal 1,3- β -D-glükán tartalmában az echinocandin kezelés következtében, míg a kitin mennyiség nagymértékben megnövekedett (4,0-6,6-szoros) (Bizerra és mtsai. 2011).

A kontroll (normál) sejtek fala két rétegből áll: egy külső, nagy elektrondenzitású és egy belső, kisebb elektrondenzitású rétegből. A paradox növekedő sejtek belső sejtfal rétege csökkent, mely 1,3- β -D-glükánból állt, a külső réteg pedig, megnövekedett. A vizsgálat során a sejteket calcofluor white-tal is megfestették, mely specifikusan a kitinhez kötődik. Fluoreszcens mikroszkóppal azt figyelték meg, hogy a kontroll sejtek kis intenzitással fluoreszkálnak, viszont a paradox módon növekedő sejtek sokkal intenzívebben látszódnak és a festék eloszlás is sokkal heterogénebb (7. ábra). A sejtek ultrastruktúrájára jellemző még a megnagyobbodott blasztospóra, a sejtek csoportosulása és a filamentáció hiánya. Mivel a PG-t mutató sejtek nem képeznek fonalat és a legtöbb virulencia faktor főleg a fonalas növekedési fázisban expresszálódik, ezért Bizerra és munkatársai (2011) arra a következtetésre jutottak, hogy ez okozza a csökkent virulencia faktor mennyiséget és ebből eredően a sejtek fertőzőképességének nagymértékű romlását.



7. ábra. A kontroll (A-B) és a paradox növekedést mutató (C-D) gombasejtek fénymikroszkópos és fluoreszcens mikroszkópos képe (fluoreszcens intenzitás mértéke \pm szórás) (Bizerra és mtsai. 2011)

A PG háttérben a sejtfal anyagcsere folyamatáért felelős protein kináz C (PKC) és a Ca^{++} -calcineurin anyagcsere útvonal túlműködése áll, ami a gomba sejtfalát alkotó kitin szintézis fokozódásához vezet (Cowen 2009, Stevens és mtsai. 2006).

A PKC folyamat kulcsenzime a Rho1 terméke, mely kapcsolatba lép az Fks fehérjéssel és a PKC enzimmel is. Ez a mitogén-aktivált MAP-fehérje regulátor enzime, mely a sejtingegritásért felelős reakcióvonalat is aktiválja. Egyéb fontos fehérjéssel való kölcsönhatása miatt azt feltételezik, hogy a Rho1-protein a kapcsoló fehérje, mely elindítja, ill. megállítja a 1,3- β -glükán szintézisét (Popolo és mtsai. 2001). A PG-ben szerepet játszik a hősokk protein 90 (Hsp90) is. A Ca^{++} -calcineurin útvonal révén a Hsp90 a calcineurin katalitikus alegységéhez kapcsolódik, aktiválja azt, majd adaptációs útvonalakon az antifungális szer csökkent hatásához, illetve kompenzáló kitin szintézishez vezet (Cowen 2009).

Egy átfogó *in vitro* kísérletben (Chamilos és mtsai. 2007) azt figyelték meg, hogy a *C. albicans*-ok 60%-a, a *C. parapsilosis*-ok 90%-a, a *C. tropicalis*-ok 40%-a és a *C. krusei* izolátumok 10%-a mutatott PG-t CAS jelenlétében. MICA esetében a *C. tropicalis*-ok 70%-nál és a *C. krusei*-k 60%-nál, míg ANI-nál a *C. albicans*-ok 40%-nál és a *C.*

tropicalis-ok 20%-nál fordult elő ez a jelenség. *C. glabrata* egy echinocandinnal szemben sem mutatott PG-t.

Stevens és kutatócsoportja (2006) 21 *C. albicans* klinikai izolátumot vizsgált meg, amelyben három izolátum mutatott PG-t annak ellenére, hogy a MIC értékük alacsony, 0,09 mg/l volt.

Bizerra és munkatársai (2011) a PG-t CAS jelenlétében vizsgálták mikrodilúciós módszerrel. Az eredményeket idő-ölés kísérletekkel is alátámasztották. *C. albicans* és *C. tropicalis* MIC értékei 0,25-0,5 mg/l tartományba estek, PG pedig 8-16 mg/l koncentráción fordult elő. *C. parapsilosis* és *C. orthopsilosis* izolátumok (MIC= 1 mg/l) is mutattak PG-t 8-32 mg/l gyógyszerkoncentráción.

Munkacsoportunk *C. tropicalis*-szal végzett idő-ölés kísérletek során a CAS MIC feletti értékein ($\leq 3,12$ mg/l) fungicid hatást figyelt meg, míg a legmagasabb (6,25- 12,5 mg/l) CAS koncentrációkon csak fungisztatikus hatás volt észlelhető (Sóczó és mtsai. 2007).

PG-t *in vivo* is megfigyeltek már. Invazív aspergillózisban szenvedő neutropéniás nyúl-modellben a 3 és 6 mg/kg/nap CAS dózisoknál magasabb volt a tüdőből kitenyészített gombatelepek száma, mint az 1 mg/kg/nap CAS dózis esetében (Petraitiene és mtsai. 2002). Clemons és munkatársai (2006) *in vitro* PG-t mutató *C. albicans*-szal fertőzött egereket vizsgáltak. A különböző CAS kezelések közül az 5 mg/kg/nap volt a leghatásosabb, míg a 20 mg/kg/nap dózis közel hasonló eredményt produkált, mint a napi 0,1 mg/kg, habár a kísérlet megismétlésekor már nem tapasztaltak PG-t.

3. Célkitűzés

Kísérleteinkben a caspofunginnak, micafunginnak, valamint a kitin szintézis gátló nikkomycin Z-nek az *in vitro* aktivitását vizsgáltuk a DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézetében izolált, klinikailag jelentős *Candida* fajok ellen mikro- és makrodilúciós módszerek segítségével.

Célul tűztük ki:

- a micafungin MIC meghatározását és összehasonlítását RPMI-1640 és RPMI-1640 + 50% humán szérum jelenlétében a különböző *Candida* fajok ellen, valamint a gyógyszer hatékonyságának tanulmányozását a kétféle tápközegben idő-ölés kísérletek segítségével.
- a caspofungin és a nikkomycin Z MIC értékeinek meghatározását a különböző *Candida* fajok ellen, majd ezek ismeretében idő-ölés görbék felvételével tanulmányozni és összehasonlítani a caspofungin és a nikkomycin Z ölü hatását külön-külön, illetve együttesen RPMI-1640 és 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640 tápközegben.
- a kísérlet során a magas koncentrációban adott caspofungin esetében jelentkező paradox növekedés megfigyelését és változását a nikkomycin Z, illetve a tápközeghez hozzáadott humán szérum jelenlétében.

4. Anyagok és módszerek

4.1. A vizsgált gombafajok eredete

A MICA *in vitro* vizsgálatához 8 *Candida* faj 24 klinikai izolátumát és 5 ATCC tesztörzset (American Type Culture Collection) használtunk. Az összes *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* és háromból egy *C. inconspicua* izolátum vérből származott. Az izolátumok azonosítása API ID32C és CHROMagar *Candida* táptalaj segítségével már korábban megtörtént. A *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* és *C. inconspicua* fajok azonosítását pedig molekuláris biológiai módszerekkel erősítettük meg (Majoros és mtsai. 2003, Tavanti és mtsai. 2005).

A CAS *in vitro* vizsgálata során 15-15 *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* és *C. parapsilosis*, illetve 4-4 *C. dubliniensis*, *C. metapsilosis* és *C. orthopsilosis* klinikai minta PG-ét vizsgáltuk mikrodilúciós és idő-ölés módszerrel, melyek közül fajonként 2-5 izolátumot használtunk fel a további kísérletekhez. Azonosításuk és a tenyészet tisztaságának ellenőrzése az előzőekben leírt módszer szerint zajlott le. A *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* fajok azonosítása korábban már megtörtént molekuláris biológiai eljárásokkal. (Somogyvari és mtsai. 2007, Tavanti és mtsai. 2005).

A *C. metapsilosis* és a *C. orthopsilosis* izolátumokat Tavanti és munkatársai (2005) bocsájtották a rendelkezésünkre.

4.2. Érzékenység meghatározása mikrodilúciós módszerrel

A CAS, MICA és a NIK minimális gátló koncentráció (MIC) értékeinek meghatározását a standard CLSI M27-A3 dokumentum ajánlása alapján végeztük el (CLSI 2008a).

Sabouraud agaron nőtt 24 órás tenyészeteket alkalmaztunk az egyes törzsek gombaszuszpenzióinak elkészítéséhez. Denzitométer segítségével 0,5 McFarland sűrűségű oldatot készítettünk, melyhez 0,9 %-os fiziológiás sóoldatot adtunk. A MIC értékek meghatározásához 96 üregű ELISA-táplemezeket használtunk. Az egyes gombáknál

pozitív (gyógyszert nem tartalmazó) és negatív (gombát nem tartalmazó) kontrollt is alkalmaztunk.

A gyógyszereket steril desztillált vízben oldottuk fel és 0,015-8 mg/l koncentráció értékek között vizsgáltuk a MIC értékeket. MICA esetében a mikrodilúciós módszert RPMI-1640 + 50% humán szérum (Sigma, Budapest) jelenlétében is elvégeztük, ahol 0,06-32 mg/l gyógyszerkoncentrációkat használtunk. A NIK (Sigma, Budapest) legmagasabb vizsgált koncentráció értéke a kísérleteink során 8 mg/l volt, mivel ez a maximálisan elérhető érték a szérumban (Nix és mtsai. 2009).

Ezt követően a táplemezeket 35°C-on inkubáltuk, majd az üregek tartalmát pipettával összeszuszpendáltuk és leolvastuk az eredményeket.

A MIC értékek meghatározását 24 óra után végeztük el CAS (Cancidas, Merck) és MICA (Mycamin, Astellas), valamint 48 óra elteltével NIK esetében. A szuszpenzió zavarosságának vizsgálatát vizuálisan határoztuk meg a prominens gátlás kritériuma alapján (CLSI 2008a). A MIC az adott antifungális szer azon legkisebb koncentrációja volt, melynél az üregek zavarossága jelentős - legalább 50%-os - csökkenést mutatott a gombakontrollhoz képest.

4.3. Az antifungális hatás vizsgálata idő-ölés görbék segítségével

A kísérleteket Klepser és munkatársai (1998) által leírt standardizált módon végeztük el.

MICA esetében mind az RPMI-1640, mind a humán szérummal kiegészített tápközeg esetén 0,5-16x MIC koncentrációkat alkalmaztunk, a legmagasabb vizsgált MICA koncentráció pedig, 64 mg/l volt (Ernst és mtsai. 2002a).

A CAS idő-ölés görbéit 0,125-16 mg/l, míg a NIK-t 0,125-8 mg/l koncentráció értékek között vettük fel RPMI-1640-ben. A két szer kombinációjánál a CAS-t minden koncentrációértéknél vizsgáltuk (0,125-16 mg/l), míg a NIK-nél az adott izolátum MIC értékét vettük alapul. Ahol a NIK MIC ≥ 8 mg/l volt, ott csak a legmagasabb, 8 mg/l koncentrációt használtuk. Az ennél alacsonyabb MIC értékek esetén a MIC-cel megegyező, illetve annál nagyobb koncentrációkat is vizsgáltuk 8 mg/l-ig.

Ötven százalék humán szérummal kiegészített RPMI-1640 tápközegben 2-2 *C. albicans*-t (10920 és 17433), *C. tropicalis*-t (555 és 375), *C. glabrata*-t (6605 és 14545) és *C. parapsilosis*-t (9150 és CP117), valamint 1-1 *C. metapsilosis*-t (CP5) és *C. orthopsilosis*-t (CP85) vizsgáltunk. A CAS koncentrációi 32, 16, 1 és 0,125 mg/l voltak, míg a CAS + NIK kombináció esetén 8 mg/l NIK-t adtunk 16, 1 és 0,125 mg/l koncentrációjú CAS-hoz.

A kísérlet során 10^5 CFU/ml (Colony Forming Unit/ml) kiindulási inokulumot alkalmaztunk. A csöveket sötétben, folyamatos rázatás mellett, 35 °C-os termosztátban inkubáltuk. Adott időpontokban (0, 4, 8, 12, 24 és 48 óra) a csövekből 100-100 µl-eket vettünk ki, melyekkel 1:10-es léptékű sorozathígítást végeztünk el fiziológiás sóoldatban.

Ezt követően 4×30 µl mintát pipettáztunk az egyes Sabouraud agarok felszínére. 15-20 perces száradás után 48 órára, 35 °C-os termosztátba helyeztük, s végül megszámláltuk a kinőtt telepeket. Az élő gombasejtek számát (CFU) a hígítási adatok ismeretében határoztuk meg. A kapott csíraszámokat az idő függvényében grafikusán ábrázoltuk.

Fungicidnek akkor tekinthető a szer, ha a csíraszámokban legalább 99,9%-os (3-log_{10}) csökkenés tapasztalható a kiindulási inokulumhoz képest. Ha ennél kisebb a változás, akkor fungisztatikusnak tekinthető az antifungális szer az adott izolátummal szemben (Klepser és mtsai. 1998).

Paradox hatás akkor figyelhető meg idő-ölés kísérletek során, amikor az antifungális szer alacsony és magas koncentrációin növekedés észlelhető (fungisztatikus hatás), de a köztes koncentrációkon nincs gombanövekedés (fungicid hatás) (Varga és mtsai. 2008).

A CAS + NIK idő-ölés görbék esetében vizsgáltuk a gyógyszerek egymásra gyakorolt hatását. Szinergista hatás akkor tapasztalható, ha a kombinációban adott szerek legalább 100-szorosával hatékonyabbak az általunk vizsgált leghatásosabb monoterápiás szernél. Ha ez az érték alacsonyabb, akkor additív (indifferens) tekinthető a kombináció. Ha pedig a két szer gátolta egymás hatását, akkor beszélhetünk antagonizmusról (Kiraz és mtsai. 2010).

5. Eredmények

2. táblázat. A micafungin MIC értékei és az idő-ölés kísérletek eredményei a *Candida* izolátumokkal szemben RPMI-1640 és RPMI-1640 + 50% szérum jelenlétében

Klinikai izolátumok és ATCC tesztörzsek	MIC (mg/l)		Arány	idő-ölés görbék eredményei (mg/l)	
	RPMI	50 % szérum		RPMI	RPMI-1640 + 50 % szérum
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0.03	0.25	8x	≥0.03 sztatikus	≥0.25 sztatikus*
<i>C. albicans</i> 738	0.03	0.25	8x	≥0.03 sztatikus	≥0.25 sztatikus
<i>C. albicans</i> 16569	0.015	0.12	8x	≥0.015 sztatikus	≥0.25 sztatikus
<i>C. albicans</i> 14332	0.015	0.25	16x	≥0.015 sztatikus	≥0.25 sztatikus
<i>C. albicans</i> 10920	0.015	0.12	16x	≥0.015 sztatikus	≥0.25 sztatikus
<i>C. tropicalis</i> 3404	0.03	1	32x	≥0.03 sztatikus	≥1 sztatikus
<i>C. tropicalis</i> 6938	0.015	1	64x	≥0.06 sztatikus	≥1 sztatikus
<i>C. tropicalis</i> 15852	0.03	1	32x	≥0.03 sztatikus	≥1 sztatikus
<i>C. tropicalis</i> 8640	0.015	1	64x	≥0.015 sztatikus	≥1 sztatikus
<i>C. glabrata</i> 2041	0.015	1	64x	≥0.06 cid	≥2 cid**
<i>C. glabrata</i> 14188	0.015	1	64x	≥0.06 cid	≥2 cid
<i>C. glabrata</i> 14846	0.015	1	64x	≥0.25 cid	≥2 cid
<i>C. glabrata</i> 14545	0.015	1	64x	≥0.06 cid	≥2 cid
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0.12	2	16x	≥0.12 cid	≥4 cid
<i>C. krusei</i> 5029	0.12	8	64x	≥0.25 cid	≥32 cid
<i>C. krusei</i> 27393	0.12	8	64x	≥0.25 cid	≥32 cid
<i>C. krusei</i> 4363	0.12	8	64x	≥0.12 cid	≥16 cid
<i>C. inconspicua</i> 22027	0.03	2	64x	≥0.06 cid	≥4 cid
<i>C. inconspicua</i> 22838	0.03	1	32x	≥0.06 cid	≥4 cid
<i>C. inconspicua</i> 12060	0.015	2	128x	≥0.12 cid	≥4 cid
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1	8	8x	≥4 cid	≥8 sztatikus
<i>C. parapsilosis</i> 896/1	2	32	16x	≥8 cid	≥32 sztatikus
<i>C. parapsilosis</i> 9150	2	32	16x	≥8 cid	≥32 sztatikus
<i>C. orthopsilosis</i> ATCC 96139	1	8	8x	≥2 cid	≥8 sztatikus
<i>C. orthopsilosis</i> CP85	0.25	16	64x	≥2 cid	≥32 sztatikus
<i>C. orthopsilosis</i> CP125	0.25	8	32x	≥2 cid	≥8 sztatikus
<i>C. metapsilosis</i> ATCC 96144	0.25	1	4x	≥0.25 cid	≥1 sztatikus
<i>C. metapsilosis</i> CP5	0.25	1	4x	≥0.25 cid	≥1 sztatikus
<i>C. metapsilosis</i> CP92	0.25	4	16x	≥0.25 cid	≥8 sztatikus

*fungisztatikus

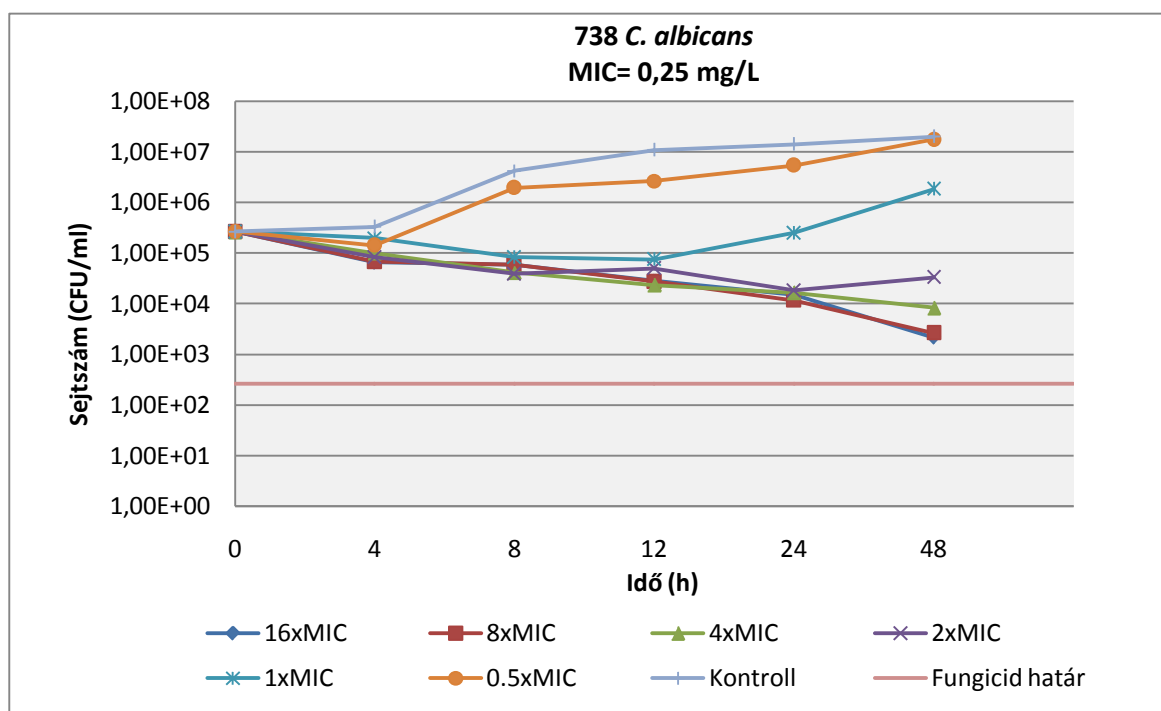
**fungicid

5.1. Micafungin iránti érzékenység vizsgálata mikrodilúciós módszerrel

RPMI-1640-ben az összes *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* és *C. parapsilosis* izolátum érzékenynek bizonyult a módosított fajspecifikus CLSI határértékeket figyelembe véve (Pfaller és mtsai. 2011b) (2. táblázat). Ötven százalék humán szérummal kiegészített tápközegben az összes *Candida* faj megfelelő növekedést mutatott, a MIC értékek 4-128x nagyobbak voltak az RPMI-1640-ben tapasztalhoz képest. Négyeszeres növekedés két *C. metapsilosis* izolátumnál volt tapasztalható, míg a legmagasabb, 128x-os csupán egy *C. inconspicua* esetében. Leggyakrabban a 64x-es MIC érték növekedés fordult elő (29-ből 11 izolátumnál) (2. táblázat).

5.2. Az idő-ölés kísérletek eredményei micafungin esetében

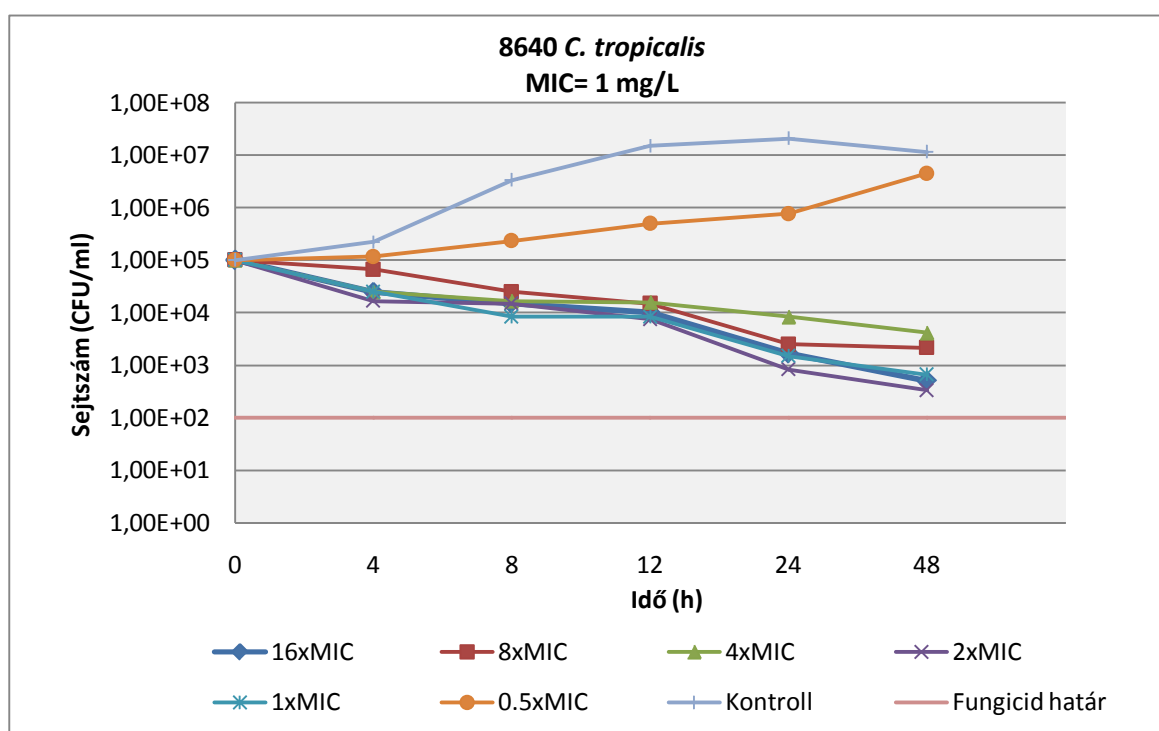
A MICA fungisztatikus aktivitást mutatott RPMI-1640-ben az összes *C. albicans* és *C. tropicalis* izolátumokkal szemben, még a legmagasabb, 16x-os MIC értéknél is. A többi faj esetében ≥ 2 -8x MIC-nél fungicid hatás volt megfigyelhető 48 óra után (2. táblázat).



8. ábra. A *C. albicans* 738 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje MICA esetében RPMI-1640 + 50% humán szérum jelenlétében

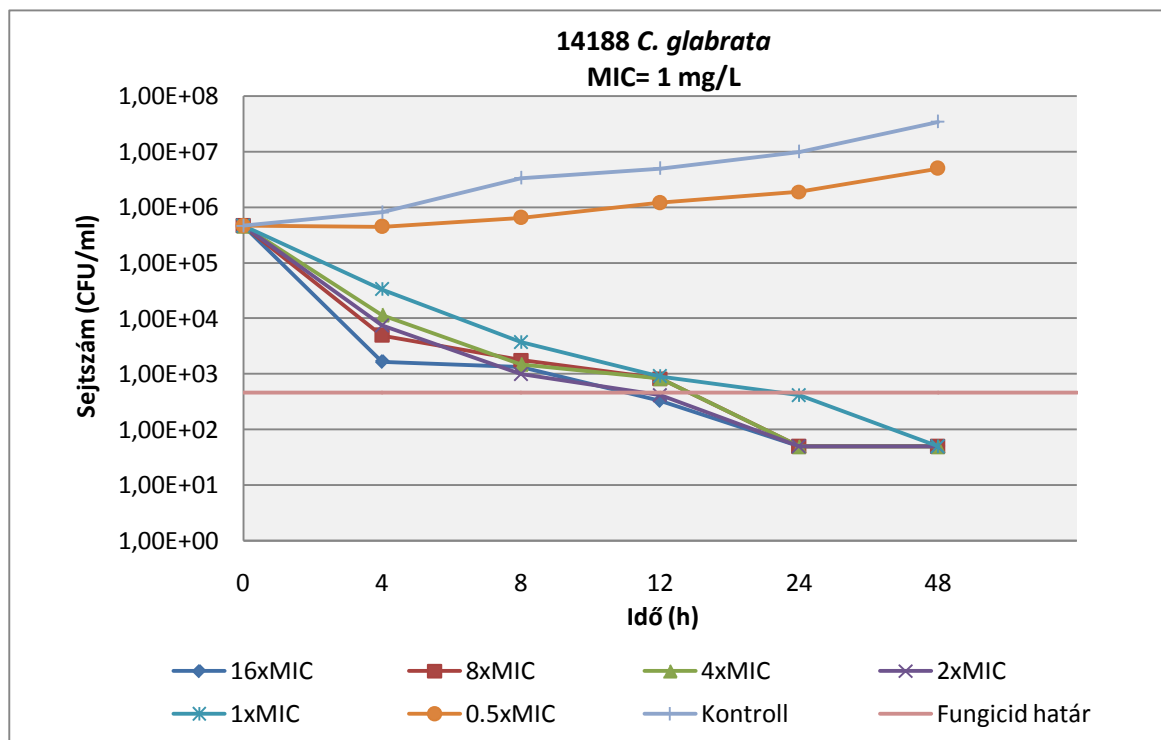
A tápközeghez adott humán szérum jelentősen csökkentette a MICA aktivitását az összes vizsgált izolátumnál. *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* és *C. orthopsilosis* esetében csak fungisztikus hatású volt a szer, míg a többi *Candida* fajnál jelentősen magasabb koncentrációértéknél következett be az ölü hatás RPMI-1640-nel összehasonlítva (2. táblázat). A 0,5x MIC idő-ölés görbéje minden faj esetében a kontroll görbéhez hasonló lefutást mutatott.

Humán szérum jelenlétében a MICA már 1-2x MIC-nél fungisztikusnak bizonyult *C. albicans* izolátumokkal szemben, míg a legmagasabb gyógyszerkoncentráción 48 óra után $-\log 1,54$ és $-\log 2,78$ CFU/ml mértékben csökkent a sejtszám. Fungicid hatás nem volt megfigyelhető (8. ábra).



9. ábra. A *C. tropicalis* 8640 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje MICA esetében RPMI-1640 + 50% humán szérum jelenlétében

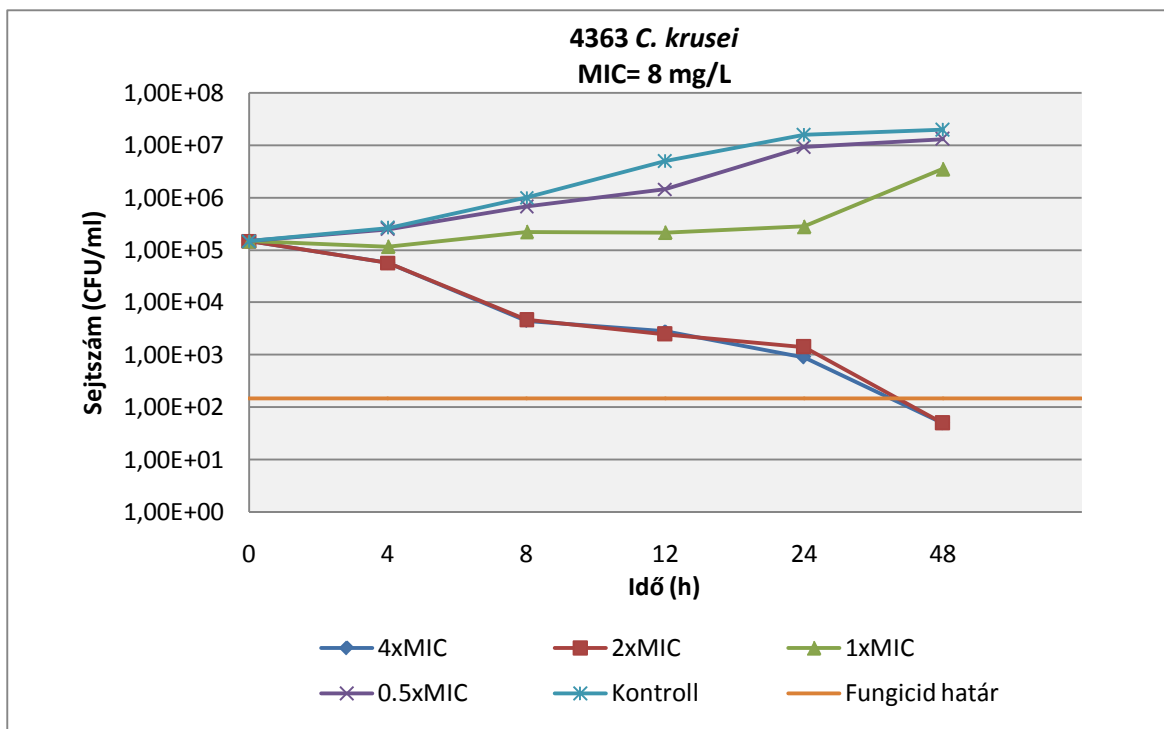
C. tropicalis és *C. glabrata* izolátumokkal szemben a MICA az idő-ölés kísérletekben fungisztikus hatású volt 1 mg/l koncentráción (1x MIC) RPMI-1640 + 50% humán szérum jelenlétében (9-10. ábra). *C. tropicalis* ellen a gyógyszer a legmagasabb koncentrációján is csak fungisztikus hatást produkált ($-\log 1,68$ és $-\log 2,63$ CFU/ml csíraszámcsökkenés) (9. ábra), míg *C. glabrata* esetében a $\geq 2x$ MIC 24 óra után már fungicidnek bizonyult (10. ábra).



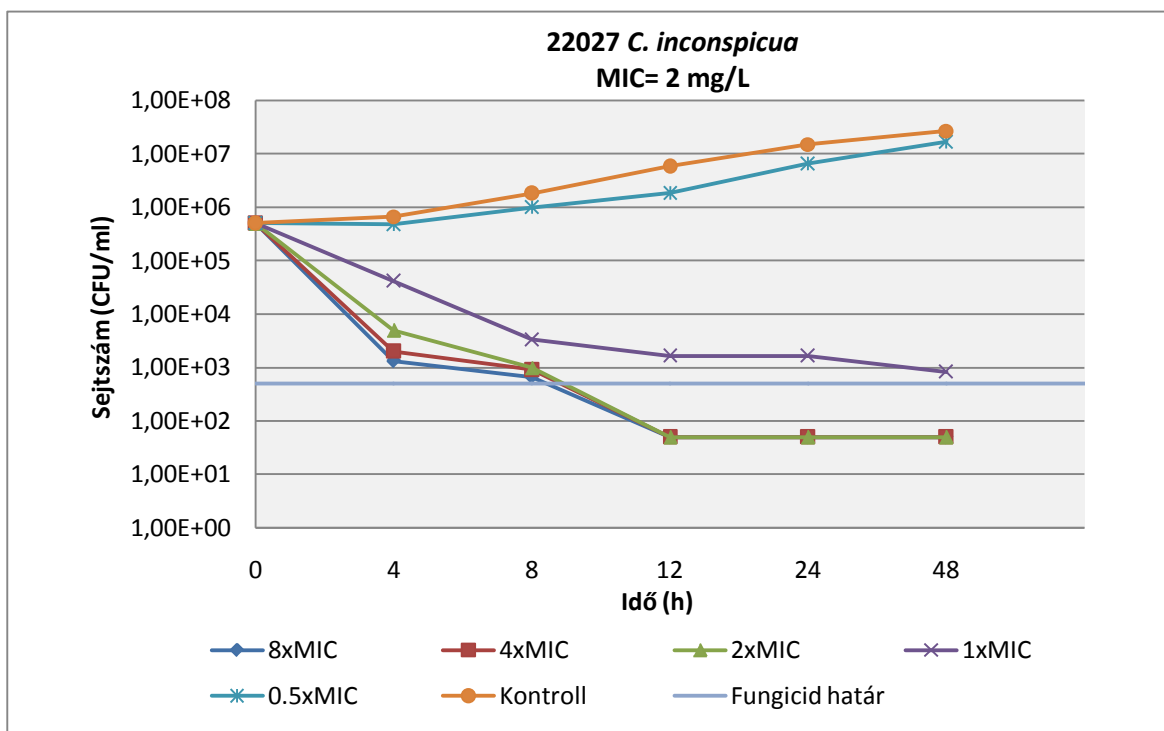
10. ábra. A *C. glabrata* 14188 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje MICA esetében RPMI-1640 + 50% humán szérum jelenlétében

C. krusei-vel szemben 1x MIC értéknél 24 óra után fungisztikus hatású volt a MICA, de ez a hatás a következő 24 óra során megszűnt és gombanövekedés volt megfigyelhető. Tizenhat mg/l gyógyszerkoncentráción fungisztikus és fungicid hatás is érvényesült, míg 32 mg/l-en (4x MIC) 48 óra elteltével az összes izolátumra ölő (fungicid) hatást fejtett ki a gyógyszer (11. ábra).

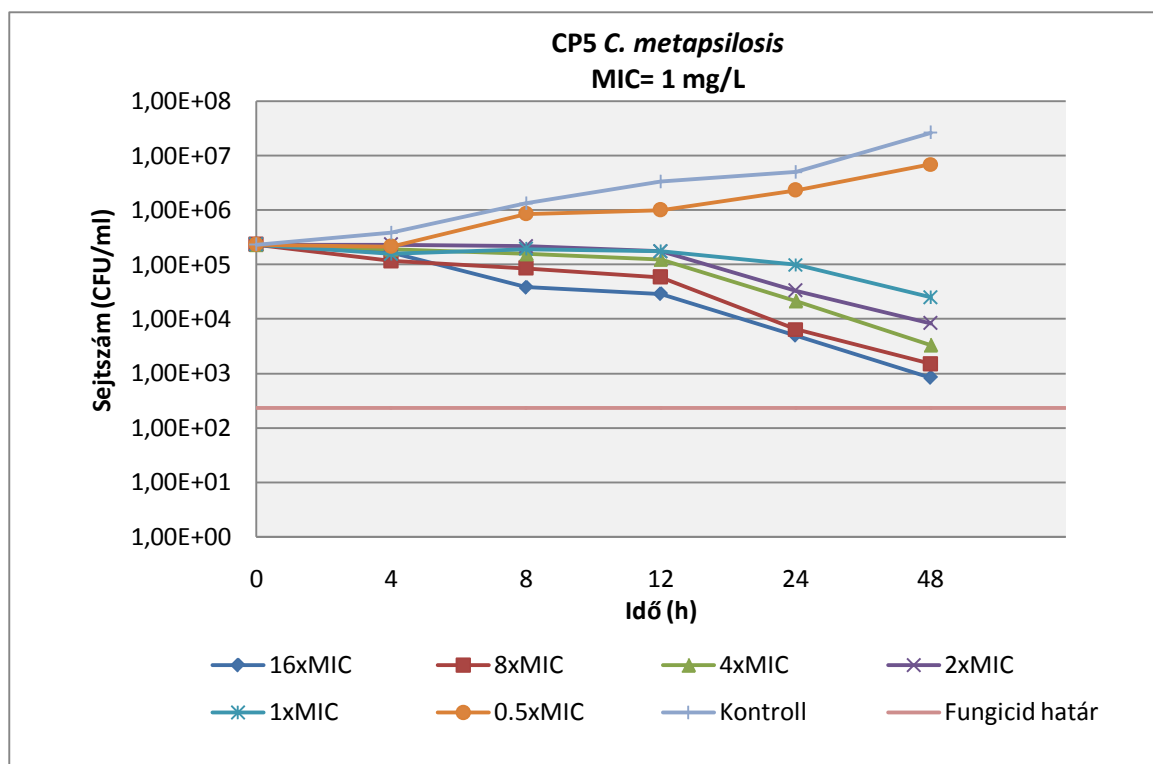
A MICA fungisztikus hatással rendelkező *C. inconspicua* izolátumaival szemben 1-2 mg/l-en. Ennél magasabb koncentrációkon (≥ 2 -4x MIC) már 12 óra után ölő hatás volt megfigyelhető (12. ábra).



11. ábra. A *C. krusei* 4363 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje MICA esetében RPMI-1640 + 50% humán szérum jelenlétében



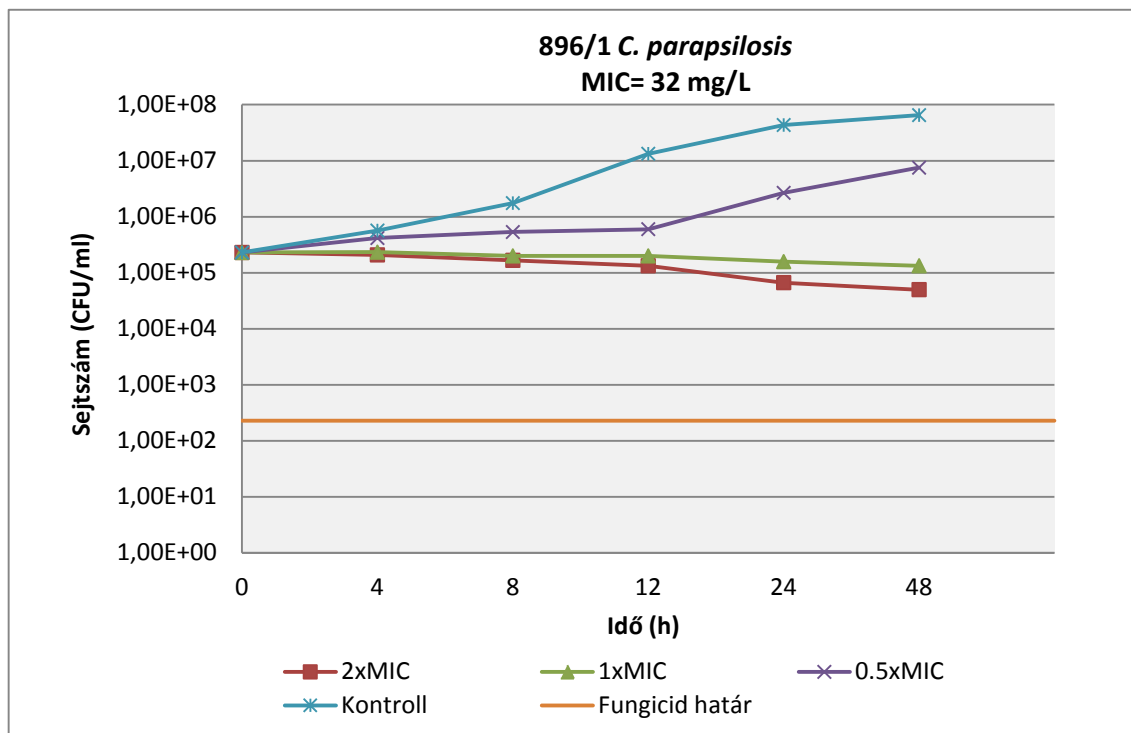
12. ábra. A *C. inconspicua* 22027 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje MICA esetében RPMI-1640 + 50% humán szérum jelenlétében



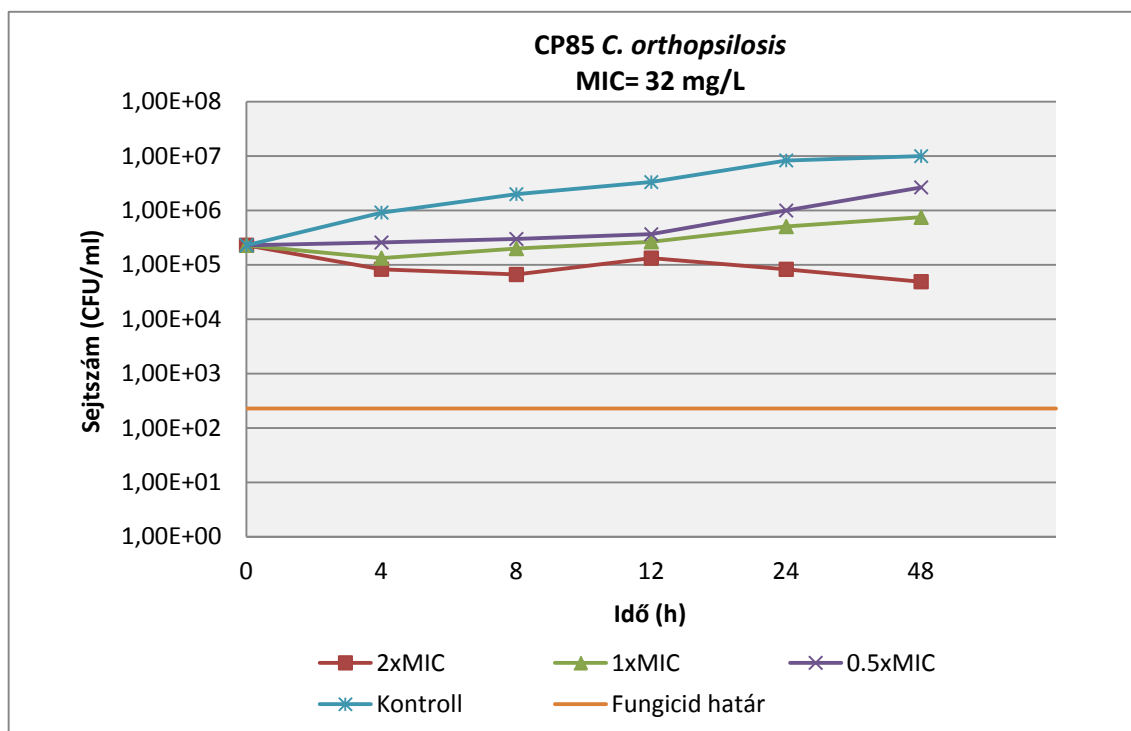
13. ábra. A *C. metapsilosis* CP5 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje MICA esetében RPMI-1640 + 50% humán szérum jelenlétében

A 'psilosis-csoportot' az idő-ölés kísérletek alapján két részre kell osztanunk. A *C. metapsilosis* esetében a magas koncentrációjú MICA erősen fungisztikus hatással rendelkezik. Egyszeres MIC (1 mg/l) értéknél is már gátolt volt a gombanövekedés, míg magasabb (8-16x MIC) gyógyszerkoncentráción $-\log$ 2,43 és $-\log$ 2,71 közötti telepszámcsökkenés is megfigyelhető 48 óra elteltével (13. ábra).

Ezzel szemben *C. parapsilosis* (14. ábra) és *C. orthopsilosis* (15. ábra) ATCC tesztörzseknél 8 mg/l-en, míg a klinikai izolátumoknál 32-64 mg/l-en (1-2x MIC) figyelhető meg gyenge fungisztikus hatás.



14. ábra. A *C. parapsilosis* 896/1 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje MICA esetében RPMI-1640 + 50% humán szérum jelenlétében



15. ábra. A *C. orthopsilosis* CP85 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje MICA esetében RPMI-1640 + 50% humán szérum jelenlétében

5.3. *Candida* fajok caspofunginra és nikkomycin Z-re vonatkoztatott MIC értékei

3. táblázat. A CAS és NIK MIC értékei *Candida* izolátumokkal szemben, illetve az idő-ölés kísérletek eredményei RPMI-1640 tápközegben

Klinikai izolátum	CAS		NIK		CAS +NIK kombináció idő-ölés kísérletekben
	MIC (mg/l)	Idő-ölés kísérletek eredménye (adott koncentráción)	MIC (mg/l)	Idő-ölés kísérletek eredménye	
<i>C. albicans</i> 4780*	0.015	PG (8-16)	4	sztatikus ¹	cid ² , indifferens
<i>C. albicans</i> 10920	0.015	PG (4-16)	8	sztatikus	cid, szinergista
<i>C. albicans</i> 19627	0.03	PG (4-16)	2	sztatikus	cid, indifferens
<i>C. albicans</i> 17433	0.015	PG (8-16)	0.25	sztatikus	cid, indifferens
<i>C. albicans</i> 19888	0.015	PG (4-16)	4	sztatikus	cid, indifferens
<i>C. dubliniensis</i> 1081	0.06	sztatikus	4	sztatikus	sztatikus, indifferens
<i>C. dubliniensis</i> 2953	0.06	sztatikus	4	sztatikus	sztatikus, indifferens
<i>C. tropicalis</i> 3404*	0.03	PG (8-16)	>8	NI	cid, indifferens
<i>C. tropicalis</i> 555*	0.03	PG (16)	>8	NI	cid, szinergista
<i>C. tropicalis</i> 375	0.015	PG (8-16)	>8	NI	cid, indifferens
<i>C. tropicalis</i> 5093	0.03	PG (16)	>8	NI	cid, indifferens
<i>C. tropicalis</i> 8640	0.03	PG (16)	>8	NI	cid, indifferens
<i>C. glabrata</i> 69	0.03	cid**	>8	NI	cid, szinergista ***
<i>C. glabrata</i> 6605	0.03	cid**	>8	NI	cid, szinergista ***
<i>C. glabrata</i> 2712	0.03	sztatikus	>8	NI	sztatikus, indifferens
<i>C. glabrata</i> 14545	0.03	sztatikus	>8	NI	sztatikus, indifferens
<i>C. glabrata</i> 27510	0.06	sztatikus	>8	NI	sztatikus, indifferens
<i>C. parapsilosis</i> 9150	1	PG (8-16)	8	NI	cid, szinergista
<i>C. parapsilosis</i> CP117	0.5	PG (8-16)	4	sztatikus	cid, indifferens
<i>C. parapsilosis</i> CP120	0.5	sztatikus	1	sztatikus	cid, indifferens
<i>C. parapsilosis</i> CP121	1	sztatikus	2	sztatikus	cid, szinergista
<i>C. orthopsilosis</i> CP85	0.12	PG (8-16)	8	NI	cid, indifferens
<i>C. orthopsilosis</i> CP125	0.12	cid (16)	2	sztatikus	cid, indifferens
<i>C. metapsilosis</i> CP5	0.25	cid (≥ 1)	4	sztatikus	cid, indifferens
<i>C. metapsilosis</i> CP86	0.25	cid (≥ 8)	1	sztatikus	cid, indifferens

* paradox növekedést (PG) mutató izolátumok CLSI mikrodilúciós teszttel

** paradox növekedést mutató izolátumok idő-ölés kísérletek során 24 óra elteltével

*** a gyógyszerkombináció 24 óra után fungicid volt az adott izolátummal szemben

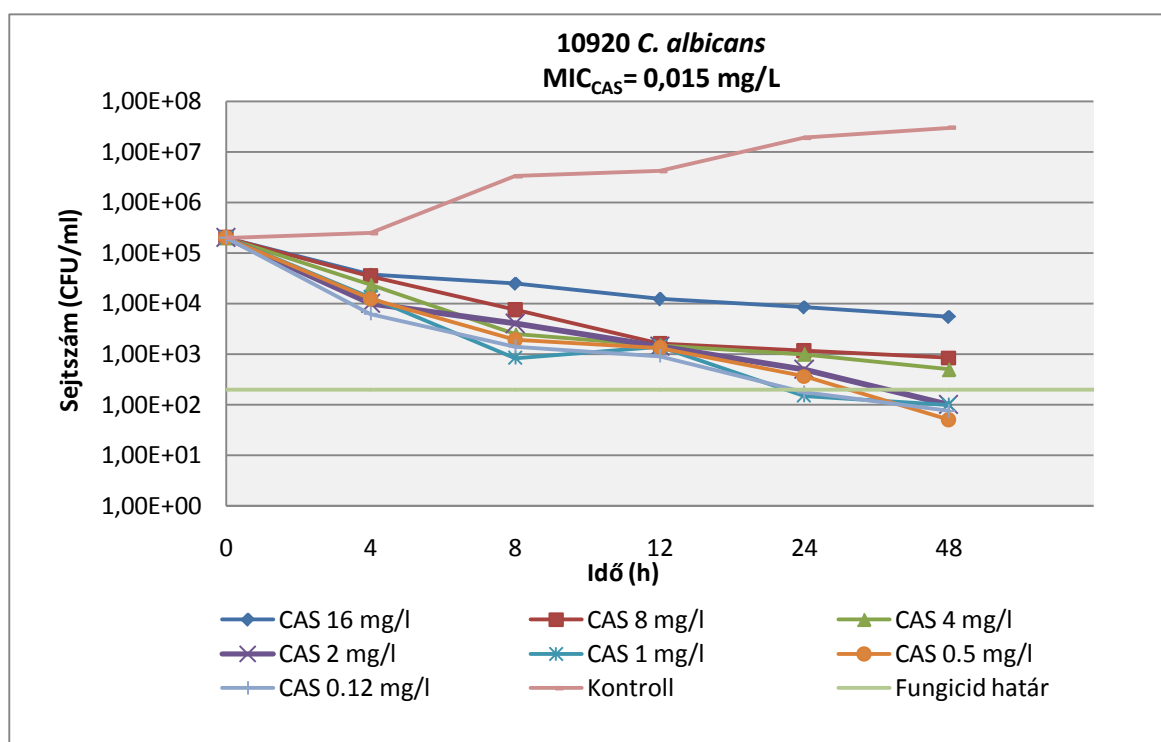
NI: nincs gátlás, 1: fungisztatikus, 2: fungicid

A CAS MIC értékei a *C. albicans*, a *C. dubliniensis*, a *C. tropicalis* és a *C. glabrata* esetében 0,015-0,06 mg/l között változtak. Ettől magasabb értékeket a *C. orthopsilosis* (0,12 mg/l) és *C. metapsilosis* (0,25 mg/l) izolátumok vettek fel, míg a *C. parapsilosis*-oknak 0,5-1 mg/l közötti MIC értékeket figyeltünk meg, de még ez is a módosított érzékenységi határértéken belül maradt (3. táblázat).

Egyik *C. tropicalis* és *C. glabrata* izolátumnál sem tapasztaltunk prominens csökkenést a gombakontrollhoz képest NIK-vel szemben. A többi faj MIC értékei NIK esetén 1-8 mg/l között változtak, kivéve a *C. albicans* 17433-at, ahol már 0,25 mg/l-en megfigyelhető volt a gátlás (3. táblázat).

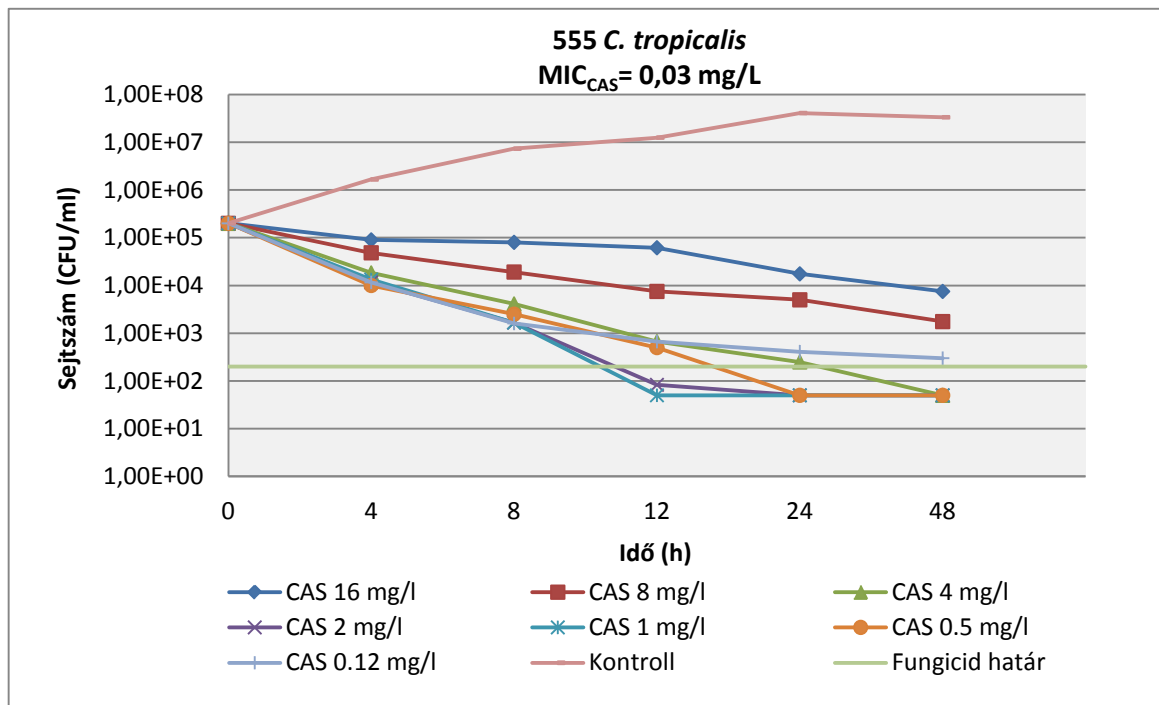
5.4. Idő-ölés kísérletek eredményei RPMI-1640 tápközegben caspofungin és nikkomycin Z esetében

5.4.1. A caspofungin gombaellenes hatása az idő függvényében



16. ábra. A *C. albicans* 10920 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje CAS esetében RPMI-1640 jelenlétében

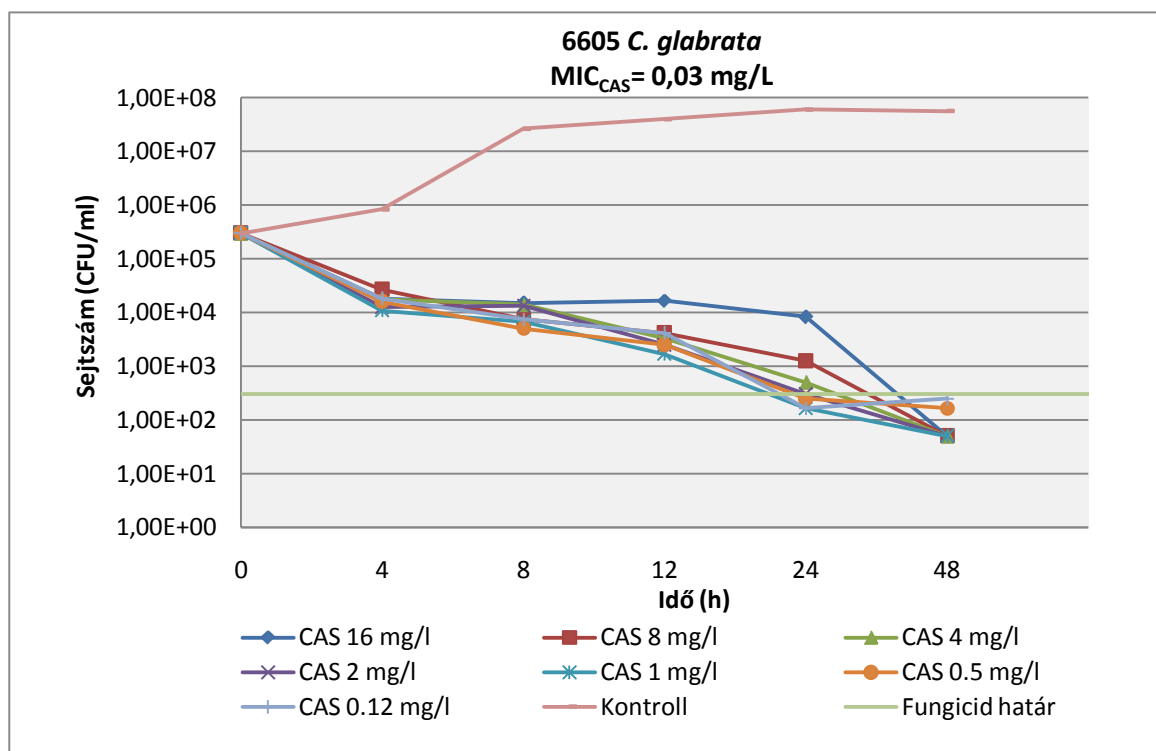
C. albicans izolátumokra jellemző, hogy magas gyógyszerkoncentrációban PG-t mutatnak. Ez a jelenség a 4780-as és a 17433-as izolátumnál 8-16 mg/l koncentráción következik be, míg a másik három törzs esetében (10920, 19627 és 19888) 4-16 mg/l között volt megfigyelhető. Alacsonyabb gyógyszerkoncentráción (0,12-2 mg/l) fungicid hatású volt a szer (3. táblázat, 16. ábra).



17. ábra. A *C. tropicalis* 555 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje CAS esetében RPMI-1640 jelenlétében

A *C. tropicalis* izolátumok esetében szintén megfigyelhető a PG. A *C. tropicalis* 3404-es és 375-ös izolátumoknál 8-16 mg/l-en, míg a többi három izolátumnál (555, 5093 és 8640) 16 mg/l gyógyszerkoncentráción. Fungisztikus volt a CAS 0,12 mg/l-en 48 óra után, de 0,5-4 mg/l között fungicid hatás volt megfigyelhető (3. táblázat, 17. ábra).

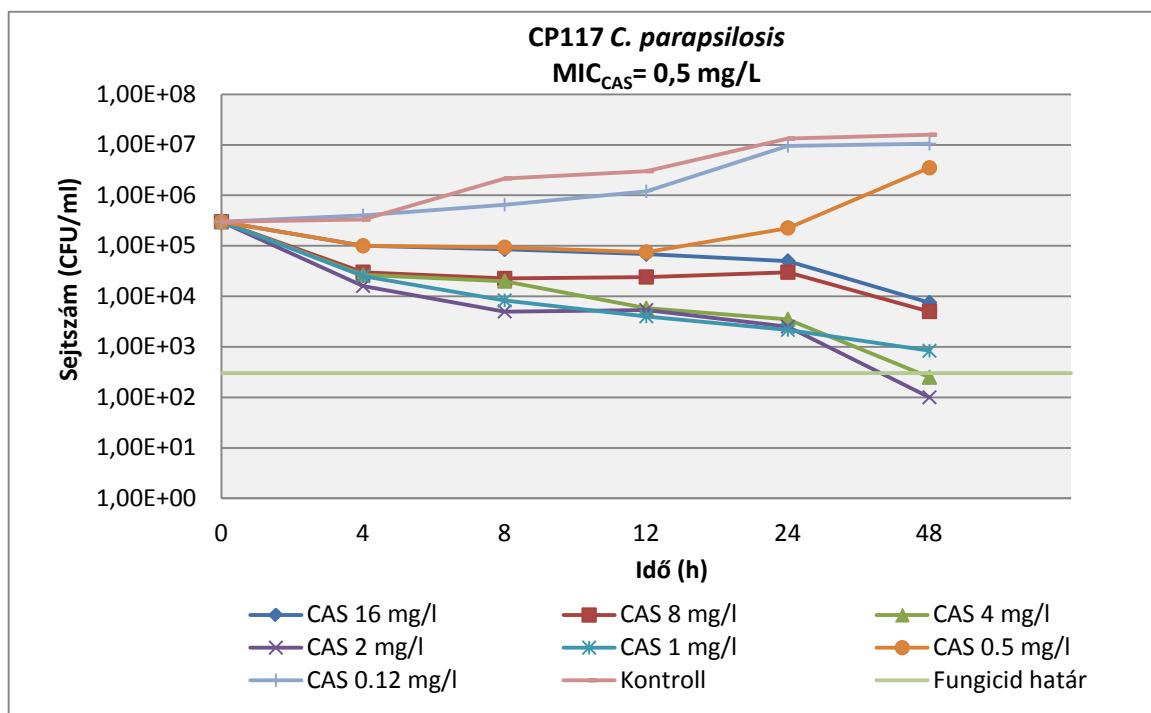
A vizsgált *C. glabrata* izolátumok közül hárommal szemben (2712, 14545 és 27510) a CAS fungisztikus hatást fejtett ki 48 óra után, míg a 69-es és 6605-ös törzs ellen fungicid volt a szer, habár 24 óra elteltével még PG volt megfigyelhető 8-16 mg/l-en (3. táblázat, 18. ábra).



18. ábra. A *C. glabrata* 6605 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje CAS esetében RPMI-1640 jelenlétében

A *C. parapsilosis* 9150 és a CP117 izolátumok PG-t mutattak 8-16 mg/l CAS koncentráció jelenlétében. Másik két vizsgált izolátum esetében (CP120, CP121) nem volt megfigyelhető a jelenség és minden gyógyszerkoncentráción fungisztikus hatású volt a szer (3. táblázat, 19. ábra).

Az összes CAS koncentráción fungisztikus hatás jelentkezett a *C. dubliniensis* izolátumokkal szemben. A *C. metapsilosis* CP5 esetében ≥ 1 mg/l, míg CP86-nál ≥ 8 mg/l fungicid hatás volt megfigyelhető. A *C. orthopsilosis* CP85 izolátum PG-t mutatott 8-16 mg/l CAS koncentráción, míg a CP125-ös izolátummal szemben 16 mg/l-en fungicid volt a szer (3. táblázat).



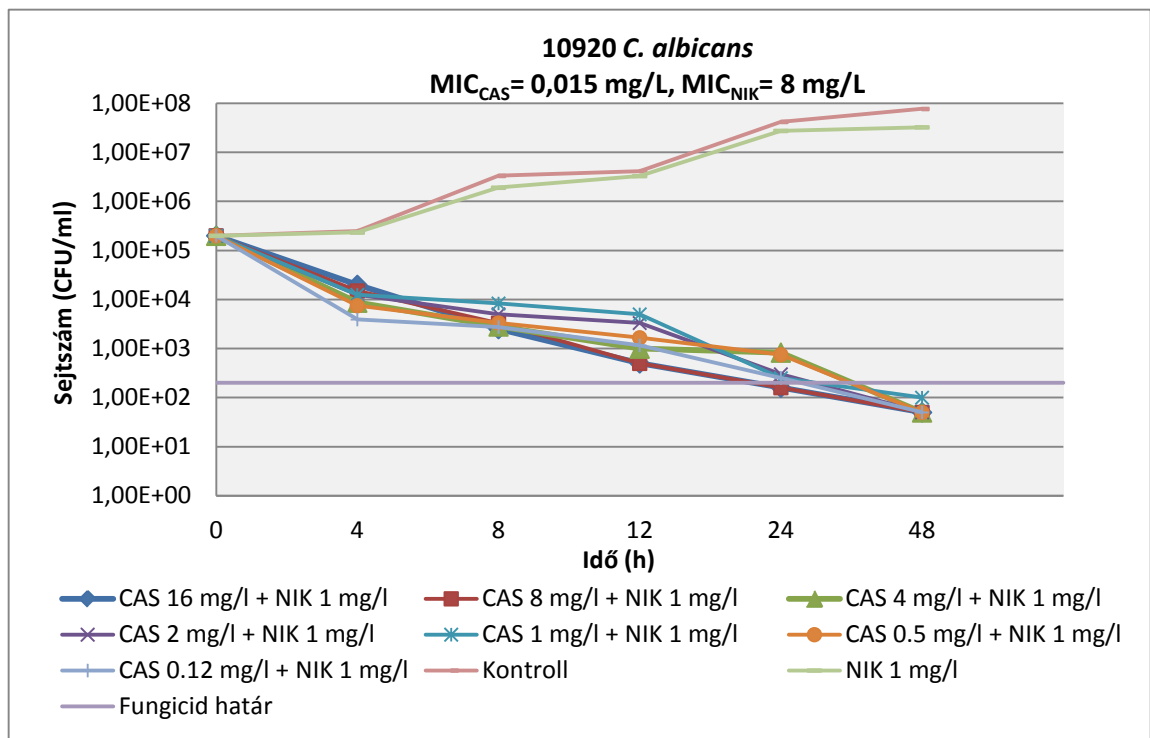
19. ábra. A *C. parapsilosis* CP117 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje CAS esetében RPMI-1640 jelenlétében

5.4.2. A nikkomycin Z gombaellenes hatása az idő függvényében

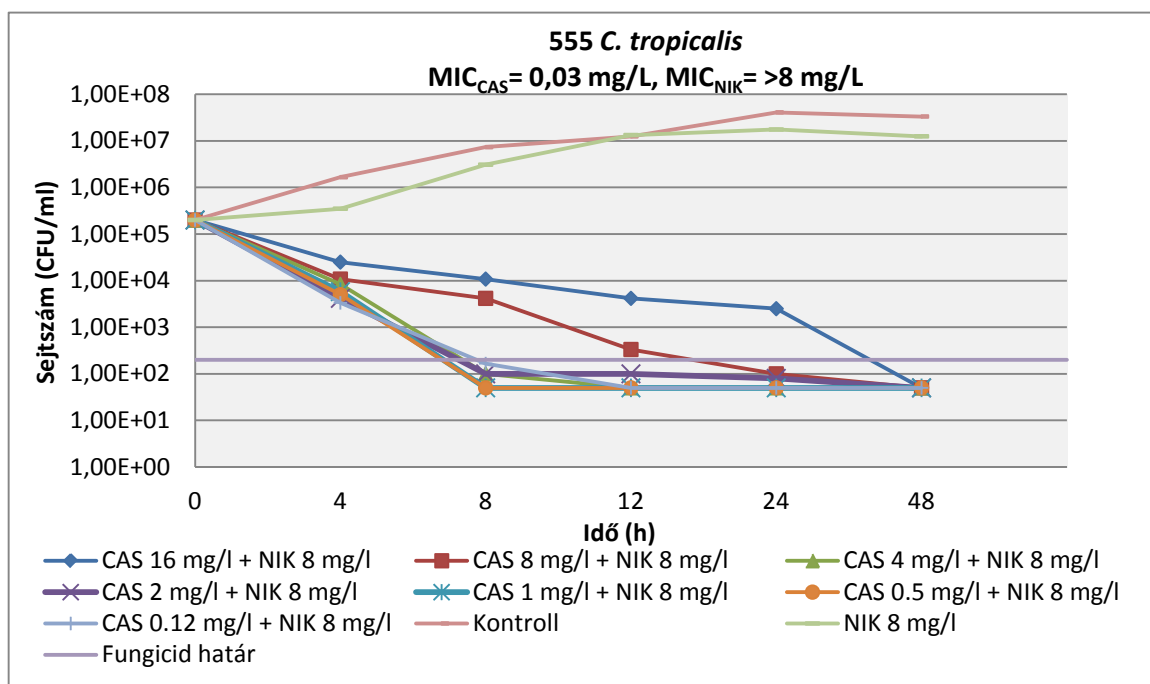
A NIK idő-ölés kísérletekben fungisztikus hatást mutatott azon izolátumokkal szemben, ahol a MIC érték 0,25-4 mg/l között volt a mikrodilúciós módszer során. A 8 mg/l NIK-t tartalmazó csövek (*C. albicans* 10920, *C. parapsilosis* 9150, *C. orthopsilosis* CP85 valamint az összes *C. tropicalis* és *C. glabrata*) idő-ölés görbéje a kontrollhoz volt hasonló (3. táblázat, 20-23 ábra).

5.4.3. Az idő-ölés kísérletek eredményei caspofungin + nikkomycin Z kombináció esetében

Antagonizmus a CAS és a NIK között nem volt megfigyelhető. Szinergizmus a *C. albicans* 10920, a *C. tropicalis* 555, a *C. glabrata* 69 és 6605, illetve a *C. parapsilosis* 9150 és CP121 izolátumoknál tapasztaltunk, ami relatíve magas CAS koncentráción (≥ 4 mg/l) és még MIC érték alatti NIK koncentráción (1 mg/l-en) is megjelent. A többi esetben a két szer indifferens volt egymásra nézve, mely nagy részben fungicid hatással párosult, kivéve a *C. dubliniensis* izolátumokat és a szinergizmust nem mutató *C. glabrata*-kat (3. táblázat, 20-23. ábra). A NIK minden esetben megszüntette a CAS-nál tapasztalt PG-t (20-23. ábra).



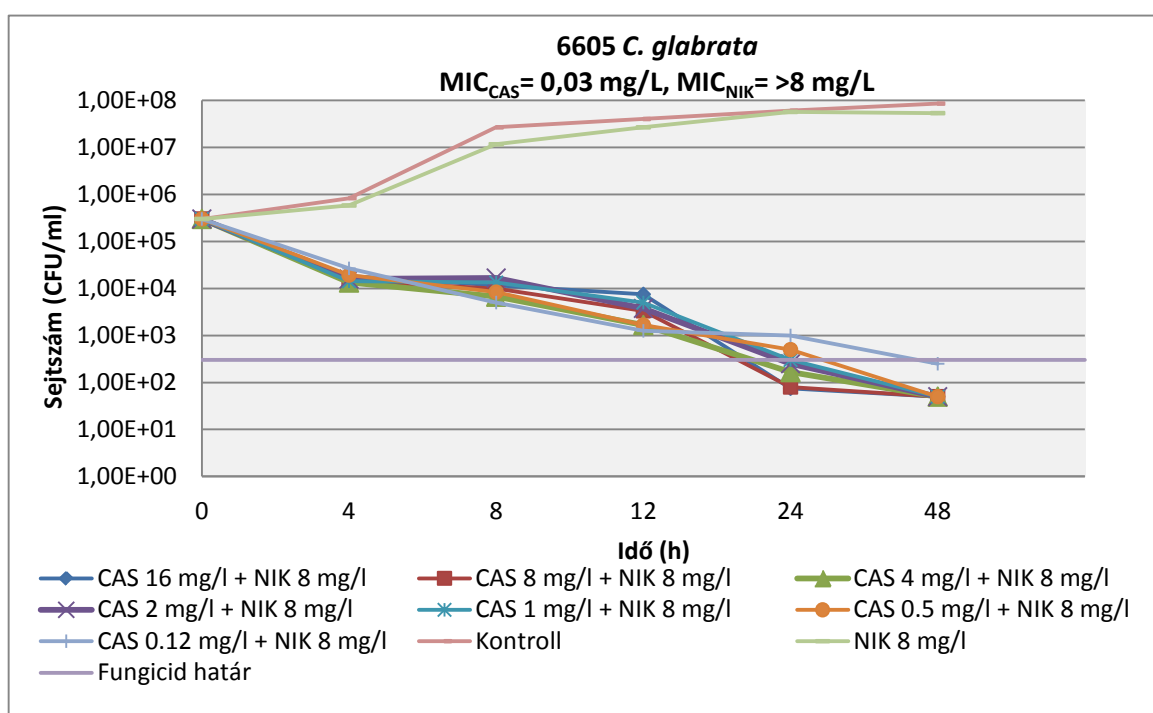
20. ábra. A *C. albicans* 10920 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje CAS + NIK kombinációval RPMI-1640 jelenlétében



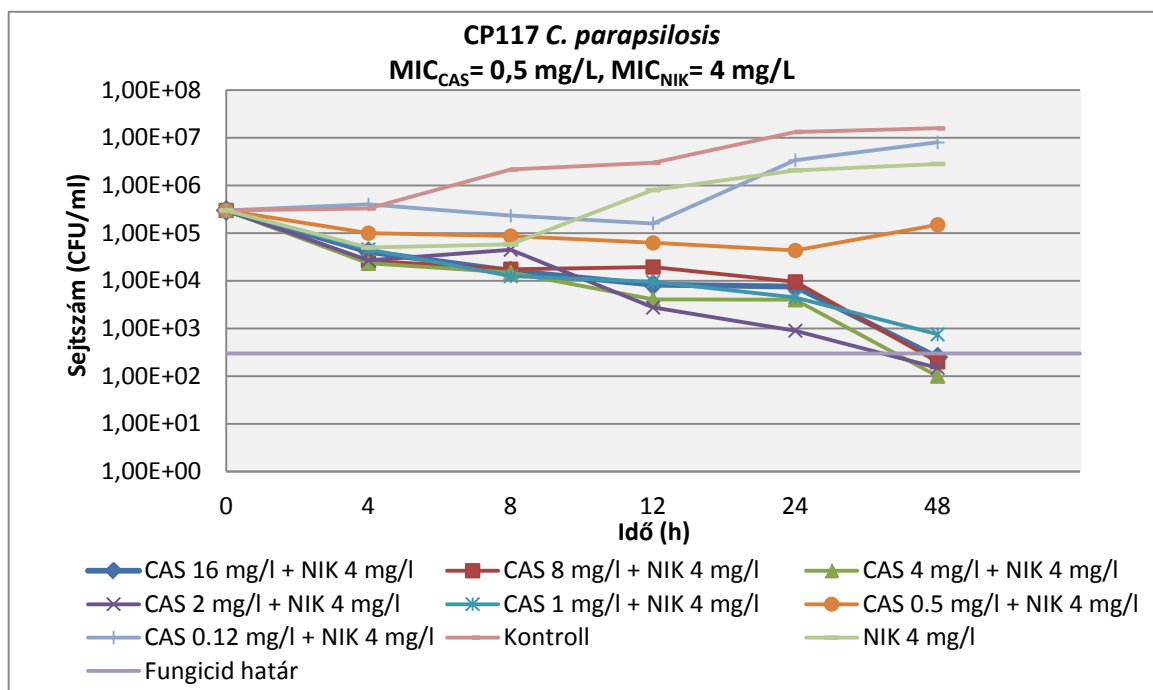
21. ábra. A *C. tropicalis* 555 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje CAS + NIK kombinációval RPMI-1640 jelenlétében

Azon *Candida* izolátumoknál, melyekkel szemben szinergizmust mutat a CAS + NIK kombináció, jól megfigyelhető, hogy 48 óra után minden gyógyszerkombinációnál fungicid hatás tapasztalható annak ellenére, hogy a NIK nem csökkentette a gombatelepek számát monoterápiás szerként alkalmazva (20-22. ábra). A PG-t a kombináció minden esetben megszüntette, habár *C. tropicalis* 555-ös izolátumnál 8 és 12 óránál a két legmagasabb, míg 24 óránál a 16 mg/l CAS + 8 mg/l NIK gyógyszerkoncentráció fungisztikus hatást mutatott, míg az alacsonyabb dózisok fungicidnek bizonyultak (21. ábra).

Szinergizmust nem mutató *C. parapsilosis* CP117 esetében csak a 4-8-16 mg/l CAS + 4 mg/l NIK bizonyult fungicid hatásúnak, az ettől alacsonyabb koncentrációkon fungisztikus volt a szer 48 óra elteltével, míg a 0,12 mg/l CAS + 4 mg/l NIK hasonló lefutást mutatott a kontroll görbéhez képest (23. ábra).



22. ábra. A *C. glabrata* 6605 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje CAS + NIK kombinációval RPMI-1640 jelenlétében



23. ábra. A *C. parapsilosis* CP117 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje CAS + NIK kombinációval RPMI-1640 jelenlétében

5.4.4. Idő-ölés kísérletek eredményei RPMI-1640 + 50% humán szérumban tápközegben

A CAS MIC értékei 50% humán szérumban kiegészített tápközegben *C. albicans*, *C. dubliniensis* és *C. tropicalis* fajoknál 0,12 mg/l volt, ami 2-8x-os növekedést jelent RPMI-1640-hez képest. *C. glabrata* (MIC= 0,5 mg/l), *C. parapsilosis* (MIC= 8 mg/l) és *C. orthopsilosis* (1 mg/l) 8-16x-os MIC emelkedést mutatott, míg *C. metapsilosis* izolátumok MIC értéke a 4x-esére emelkedett (1 mg/l) humán szérumban tápközegben.

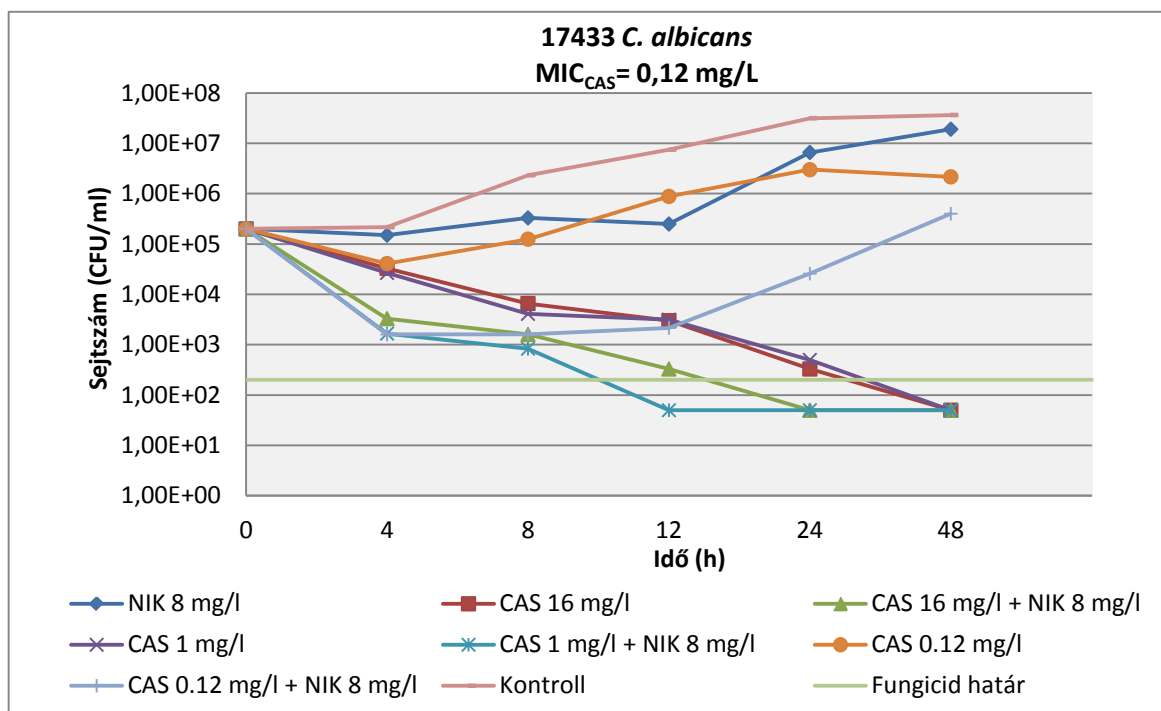
A különböző CAS koncentrációkon bekövetkező gombatelep változást a két tápközegben a 4. táblázat foglalja össze. Egy törzsnél sem fordult elő PG 50% humán szérumban tartalmazó közegben. A 0,12 mg/l gyógyszerkoncentráció minden vizsgált izolátum esetében hatástalannak bizonyult, azaz a gombák erőteljes növekedést mutattak. A *C. parapsilosis sensu lato* összes tagjánál az 1 mg/l sem gátolta a gomba növekedését, míg *C. parapsilosis* 9150 izolátum esetében még a legmagasabb koncentráció is hatástalan volt. Fungicid hatás a *C. albicans*, *C. tropicalis* és a *C. glabrata* 6605-ös izolátumainál volt megfigyelhető 16 mg/l gyógyszerkoncentráción (4. táblázat).

4. táblázat. A CAS hatása idő-ölés kísérletek során RPMI-1640 és 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640 tápközegben

Klinikai izolátum	Gyógyszer-koncentráció (mg/l)	Gombasejtszám csökkenés mértéke (log ₁₀ CFU/ml)	
		RPMI-1640	RPMI-1640 + 50% humán szérum
<i>C. albicans</i> 10920	16	-1.28*	-3.08
	1	-3.50	-1.75
	0.12	-3.38	+1.46
<i>C. albicans</i> 17433	16	-1.33*	-3.25
	1	-3.50	-3.25
	0.12	-2.38	+1.03
<i>C. dubliniensis</i> 2953	16	-1.48	-0.34
	1	-0.31	-0.04
	0.12	-0.24	+1.09
<i>C. tropicalis</i> 555	16	-1.18*	-3.30
	1	-3.25	-3.08
	0.12	-2.15	+1.82
<i>C. tropicalis</i> 375	16	-1.23*	-3.30
	1	-3.30	-3.08
	0.12	-2.25	+0.83
<i>C. glabrata</i> 6605	16	-3.78**	-4.0
	1	-3.78	-4.0
	0.12	-3.08	+1.75
<i>C. glabrata</i> 14545	16	-1.08	-1.26
	1	-1.38	-0.14
	0.12	-1.35	+1.62
<i>C. parapsilosis</i> 9150	16	-1.07*	+1.49
	1	-1.40	+1.71
	0.12	+1.40	+1.73
<i>C. parapsilosis</i> CP117	16	-1.60*	-0.10
	1	-2.56	+1.52
	0.12	+1.18	+1.68
<i>C. orthopsilosis</i> CP85	16	-1.59*	-1.21
	1	-1.19	+1.24
	0.12	+1.54	+1.51
<i>C. metapsilosis</i> CP5	16	-3.60	-2.08
	1	-3.60	+0.60
	0.12	-0.63	+1.04

* PG-t mutató izolátum idő-ölés kísérlet során 48 óra után

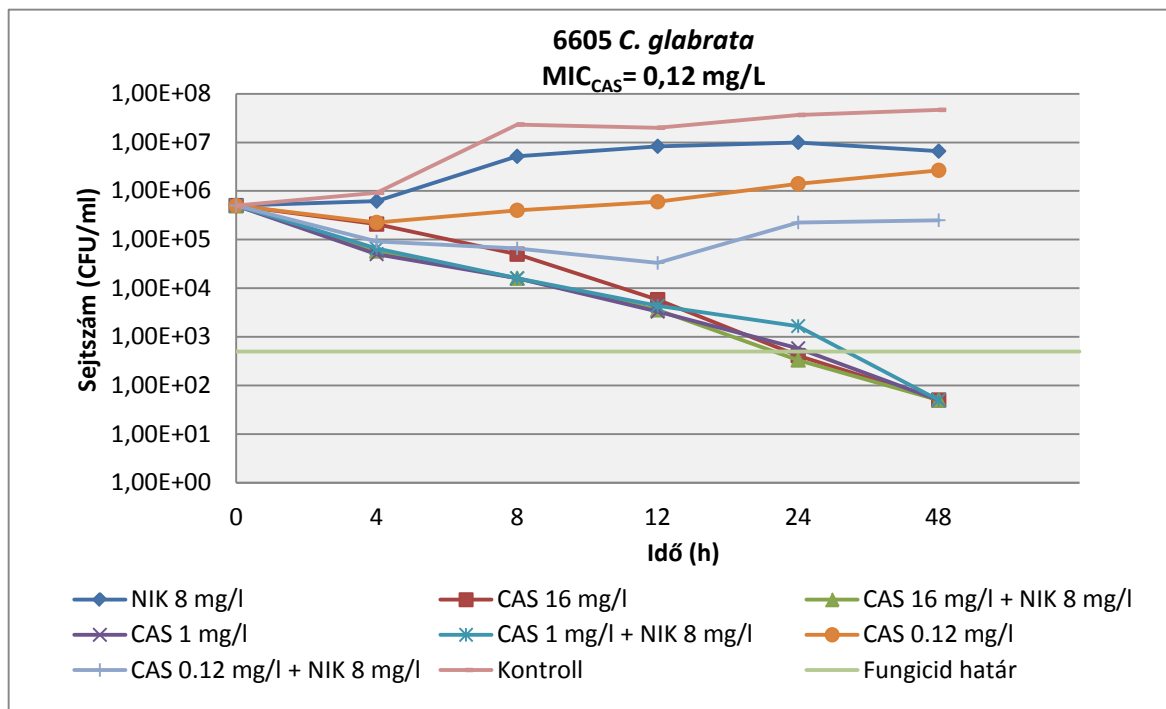
** PG-t mutató izolátum idő-ölés kísérlet során 24 óra után



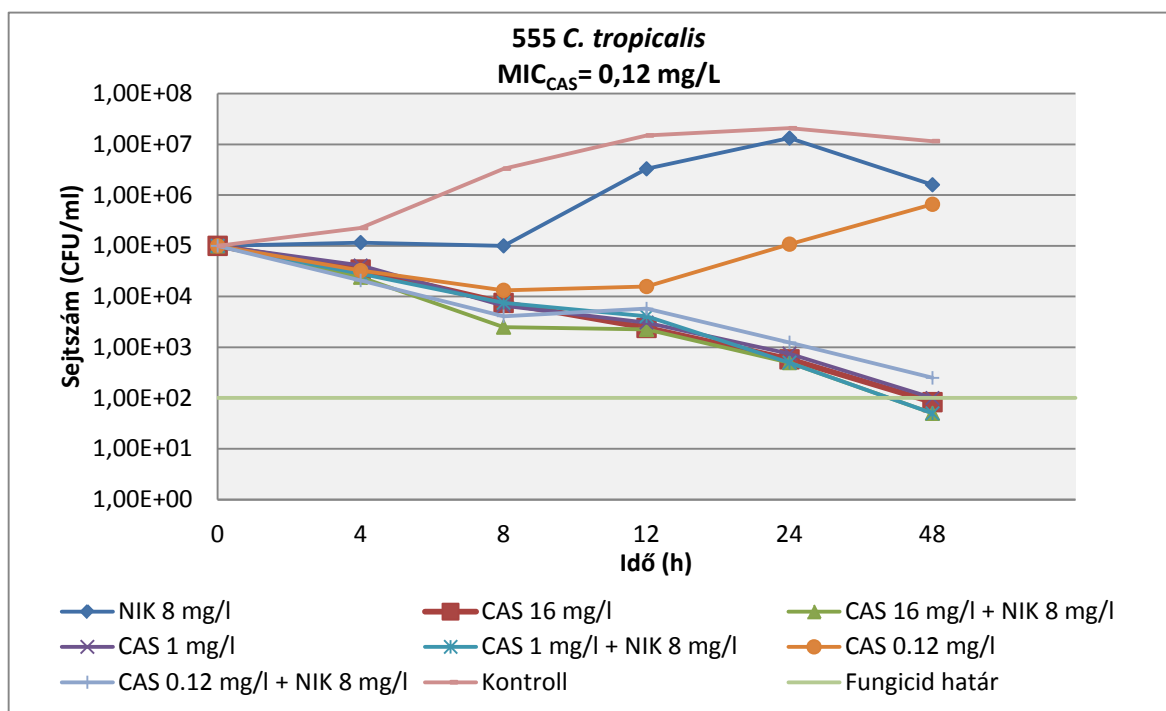
24. ábra. A *C. albicans* 17433 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje CAS + NIK kombinációval 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640 jelenlétében

C. albicans 17433 és *C. glabrata* 6605 reprezentatív idő-ölés görbéjén jól látható, hogy a monoterápiás szerként adott NIK mellett a legalacsonyabb CAS dózissal kombinált 8 mg/l NIK is hatástalannak bizonyult 48 óra elteltével. Az 1 és 16 mg/l CAS + 8 mg/l NIK kombináció 48 óra után fungicid hatást fejtett ki (24-25. ábra).

C. tropicalis 555 izolátum esetében csupán két monoterápiás dózis, a 8 mg/l NIK és a 0,12 mg/l CAS nem mutatott hatékonyságot. A többi gyógyszerkoncentrációkon erősen fungisztikus (0,12 CAS + 8 mg/l NIK) és fungicid (1 és 16 mg/l CAS + 8 mg/l NIK) hatás érvényesült 48 óra után (26. ábra).

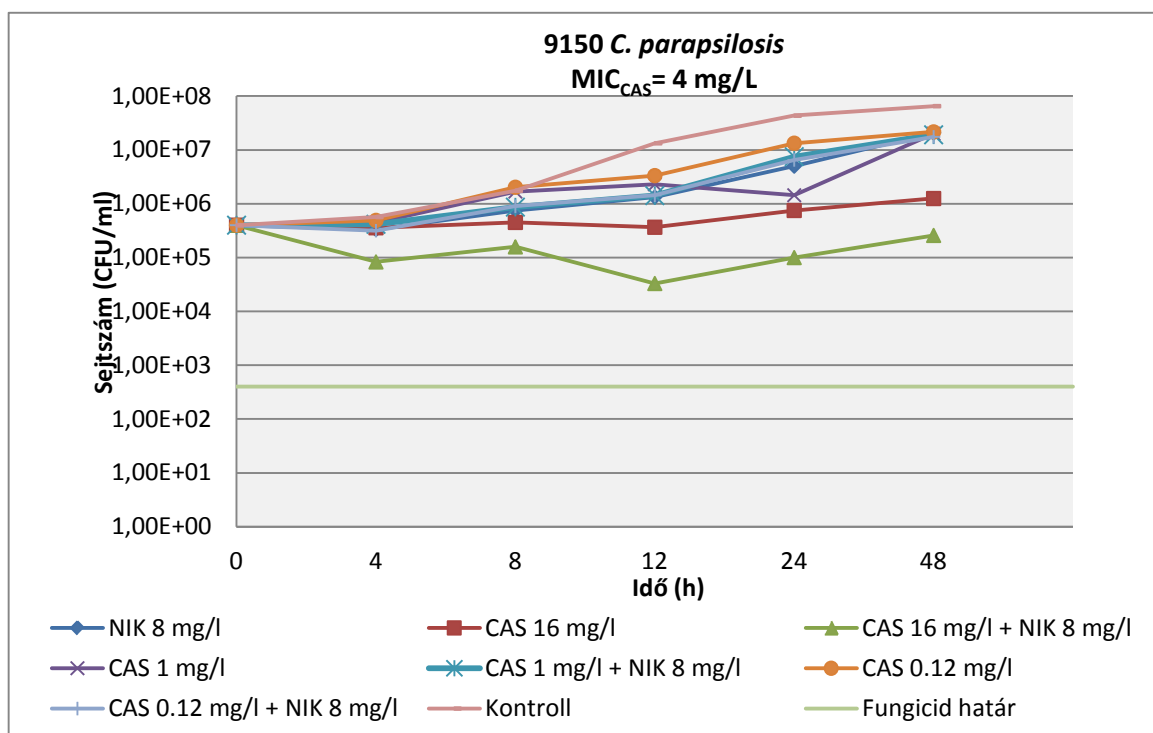


25. ábra. A *C. glabrata* 6605 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje CAS + NIK kombinációval 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640 jelenlétében



26. ábra. A *C. tropicalis* 555 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje CAS + NIK kombinációval 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640 jelenlétében

A *C. parapsilosis* 9150 izolátum idő-ölés görbéről leolvasható, hogy 48 óra elteltével csupán a legmagasabb koncentrációjú kombináció, a 16 mg/l CAS + 8 mg/l NIK csökkentette a gombatelepek számát az egyedül alkalmazott 16 mg/l CAS-hoz hasonlóan; gyenge fungisztikus hatás volt megfigyelhető. A többi gyógyszerkoncentráció nem volt hatásos (27. ábra).



27. ábra. A *C. parapsilosis* 9150 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje CAS + NIK kombinációval 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640 jelenlétében

A CAS és a CAS + NIK kombináció hatását az idő függvényében az 5. táblázat foglalja össze az 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640-ben. Szinergizmus *C. tropicalis* 555 és *C. albicans* 17443 izolátumoknál volt megfigyelhető 0,12 mg/l CAS koncentrációnál, míg *C. albicans* 10920 esetében az 1 és a 0,12 mg/l gyógyszerkoncentráció is szinergizmust mutatott. Az összes többi izolátumot figyelembe véve a két szer kombinációja indifferens (additív) volt. A *C. parapsilosis* esetében, ahol a monoterápiás szerként adott CAS hatástalannak bizonyult, a kombinációban használt CAS + NIK sem okozott jelentős telepszámcsökkenést (5. táblázat).

5. táblázat. A CAS és a CAS + NIK kombináció hatásának összehasonlítása idő-ölés kísérlettel RPMI-1640 + 50% humán szérum jelenlétében

Izolátum	CAS hatása idő-ölés kísérlet során		CAS + NIK kombináció hatása idő-ölés kísérlet során
<i>C. albicans</i> 10920	16-32 mg/l	Fungicid 48 óra után	Fungicid 48 óra után, indifferens
	1 mg/l	Fungisztatikus	Fungicid, szinergista 48 óra után
	0.12 mg/l	Fungisztatikus	Fungisztatikus, szinergista 24 óra után
<i>C. albicans</i> 17433	16-32 mg/l	Fungicid 48 óra után	Fungicid 48 óra után, indifferens
	1 mg/l	Fungicid 48 óra után	Fungicid 48 óra után, indifferens
	0.12 mg/l	Fungisztatikus	Fungisztatikus, szinergista 24 óra után
<i>C. tropicalis</i> 555	16-32 mg/l	Fungicid 48 óra után	Fungicid 48 óra után, indifferens
	1 mg/l	Fungicid 48 óra után	Fungicid 48 óra után, indifferens
	0.12 mg/l	Fungisztatikus	Fungisztatikus, szinergista 48 óra után
<i>C. tropicalis</i> 375	16-32 mg/l	Fungicid 48 óra után	Fungicid 48 óra után, indifferens
	1 mg/l	Fungicid 48 óra után	Fungicid 48 óra után, indifferens
	0.12 mg/l	Fungisztatikus	Fungisztatikus, indifferens
<i>C. glabrata</i> 6605	16-32 mg/l	Fungicid 48 óra után	Fungicid 48 óra után, indifferens
	1 mg/l	Fungicid 48 óra után	Fungicid 48 óra után, indifferens
	0.12 mg/l	Fungisztatikus	Fungisztatikus, indifferens
<i>C. glabrata</i> 14545	16-32 mg/l	Fungisztatikus	Fungisztatikus, indifferens
	1 mg/l	Fungisztatikus	Fungisztatikus, indifferens
	0.12 mg/l	Nincs hatás	Nincs hatás, indifferens
<i>C. parapsilosis</i> 9150	16-32 mg/l	Fungisztatikus	Fungisztatikus, indifferens
	1 mg/l	Nincs hatás	Nincs hatás, indifferens
	0.12 mg/l	Nincs hatás	Nincs hatás, indifferens
<i>C. parapsilosis</i> CP117	16-32 mg/l	Fungisztatikus	Fungisztatikus, indifferens
	1 mg/l	Nincs hatás	Nincs hatás, indifferens
	0.12 mg/l	Nincs hatás	Nincs hatás, indifferens

5.5. A kísérleti munkában részt vevő társszerzők munkájának ismertetése

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

Földi R, Szilágyi J, Kardos G, Berényi R, Kovács R, Majoros L. 2012. 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):338-42.

A klinikai minták beszerzése és azonosítása: Földi Richárd, Szilágyi Judit, Berényi Réka, Kovács Renátó.

Az izolátumok MIC értékének meghatározása: Földi Richárd, Szilágyi Judit, Berényi Réka, Kovács Renátó.

Idő-ölés kísérletek elvégzése RPMI-1640 és 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640 tápközegben: Földi Richárd, Szilágyi Judit, Berényi Réka, Kovács Renátó.

A kísérletes munka tervezése, eredmények kiértékelése: Földi Richárd, dr. Kardos Gábor, dr. Majoros László.

Kézirat revízió: dr. Majoros László

Szilágyi J, Földi R, Bayegan S, Kardos G, Majoros L. 2012. Effect of nikkomycin Z and 50% human serum on the killing activity of high-concentration caspofungin against *Candida* species using time-kill methodology. *J Chemother.* 24(1):18-25.

A klinikai minták beszerzése és azonosítása: Szilágyi Judit, Földi Richárd, Bayegan Sedigh

Az izolátumok CAS és NIK iránti MIC értékének meghatározása: Szilágyi Judit, Földi Richárd, Bayegan Sedigh

Idő-ölés kísérletek elvégzése CAS, NIK és CAS + NIK kombináció esetében a kétféle tápközegben: Szilágyi Judit, Földi Richárd, Bayegan Sedigh

A kísérletes munka tervezése, eredmények kiértékelése: Szilágyi Judit, Földi Richárd, dr. Kardos Gábor, dr. Majoros László

Kézirat revízió: dr. Majoros László

6. Megbeszélés

Az invazív candidiázis egy állandóan jelenlevő közegészségügyi probléma. Prevalenciája és mortalitása már több mint egy évtizede változatlan annak ellenére is, hogy az antifungális terápia területe folyamatosan fejlődik (Pfaller és mtsai. 2007).

Az 1980-as évek eleje óta a gombás fertőzések egyre nagyobb arányban jelentek meg az immunszuppresszáltak, illetve a kórházban fekvő súlyos alapbetegségtől szenvedő betegek körében (Pfaller és mtsai. 2007). Az 1979 és 2000 közötti időszakot vizsgálva az Egyesült Államokban a gombás fertőzéseknel előforduló szepszis gyakorisága több mint kétszeresére növekedett (Martin és mtsai. 2003). McNeil és munkatársai (2001) a mortalitást vizsgálva arra a megállapításra jutottak, hogy a *Candida*, *Aspergillus* és *Cryptococcus* fajok okozta mikózisok drámai módon megnövekedtek az USA-ban: 1980-ban 1557 halálesetet figyeltek meg, míg 1997-re ez a szám 6534-re emelkedett.

Az 1980-as évek végéig az AMB és az azol típusú antifungális szerek alkalmazásán alapult az antifungális terápia, melyek célpontja a gomba sejtmembránja (Lewis 2011, Pappas és mtsai. 2007). A triazolok bevezetése a klinikumba az 1990-es évek elején jó eredményeket mutatott a terápia során. A FLU miatt, bár a *C. albicans* és *C. tropicalis* okozta fertőzések gyakorisága csökkent, az egyéb, nem-albicans *Candida* fajok (pl. *C. krusei*, *C. parapsilosis*) által okozott betegségek száma megnövekedett (Pfaller és mtsai. 2007).

A sejtfalszintézist gátló echinocandinok bevezetése nagy áttörést jelentett a klinikai gyakorlatban kedvező farmakokinetikai és farmakodinámiai tulajdonságaik miatt. *In vitro* kísérletekben a *Candida* fajok MIC értéke az echinocandinok iránt általában alacsony, míg néhány faj, mint például a *C. parapsilosis* és *C. guilliermondii* esetében ≥ 2 mg/l MIC értékek is előfordulnak (Pappas és mtsai. 2007, Pfaller és mtsai. 2007).

Mindezek mellett magas MIC (> 2 mg/l) értékkel rendelkező *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* és *C. tropicalis* klinikai izolátumokat is leírtak már, ami a glükán-szintáz enzim Fks1 alegységének a HS1 és HS2 régióiban történt aminosav változása miatt fordulhat elő (Chen és mtsai. 2011, Pfaller és mtsai. 2007, Walker és mtsai. 2008).

Az előbb említett, aminosavcserében megnyilvánuló rezisztenciát általában elkülönítik a magas echinocandin koncentráció jelenlétében történő, a sokszor jóval a MIC érték feletti gombanövekedéstől. Ez a paradox jelenség egy stresszválasz-reakció, mely során a túlélő sejtek sejtfalában a β -1,3-glükánt felváltja a kitin (Bizerra és mtsai. 2011). A magas CAS koncentráció a *C. albicans* sejtfal β -1,3 glukán mennyiségét 81 %-ban csökkentette, míg a kitin szintet hatszorosa növelte (Stevens és mtsai. 2006).

A Shields és munkatársai (2011a) által végzett kísérletek alapján RPMI-1640-ben 8 mg/l koncentrációjú CAS-t alkalmazva 5-60 perc után a PG az összes olyan *C. albicans* izolátumnál megszűnt, melyeknél idő-ölés kísérletekben megfigyelhető volt a jelenség. Az eredményekből arra lehet következtetni, hogy *in vitro* a PG kialakulásához szükséges a hosszantartó CAS expozíció. Továbbá a jelenség szintén eliminálható a mikrodilúciós kísérletek alapján a gomba sejtfalában található kitin szintáz gátló NIK és CAS együttes alkalmazásával, mely bizonyítja, hogy a kompenzáló kitin szintézisnek fontos szerepe van a PG-ben (Bizerra és mtsai. 2011, Shields és mtsai. 2011a).

Az echinocandinoknak humán szérumban jelenlétében magas a fehérjekötő képessége, ezért *in vitro* kísérletekben 50% humán szérummal kiegészített tápközeg is alkalmazható, hogy az *in vivo* körülmények minél hitelesebben legyenek modellezve. A humán szérum hatása az echinocandinokra még nem teljesen tisztázott (Wiederhold és mtsai. 2007b), de Shields és munkacsoportjának (2011b) kísérlete szerint nem valószínű, hogy *in vivo* szerepe lehet a PG-nek, akár az egyszeri nagy dózisú echinocandin terápiánál sem, mivel a humán szérum, illetve az egyéb szérum faktorok megszüntették a PG-t a gyakorlatban használt gyógyszerkoncentrációkon.

Mindezen adatok ellenére a közelmúltban sikerült először leírni a klinikumban egy, a kitin szintézis fokozódása következtében fellépő echinocandin rezisztenciát. Egy 51 éves, súlyos májelégtelenségben szenvedő beteg CAS-nal történő empirikus terápiáját követően (70 mg telítő dózis után 35 mg napi dózis) olyan ritka *C. albicans*-t izoláltak vérből, ami mind FKS mutációval (HS1 régióban a 645-ös szerin cseréje prolinra), mind pedig, négyszer magasabb kitin szinttel rendelkezett a vad típushoz viszonyítva. Tehát úgy tűnik, bizonyos esetekben *in vivo* is számítani kell echinocandin terápia során a kompenzatórikus kitin szint megnövekedésére, ezáltal a gyógyszer hatástalanságára (Imtiaz és mtsai. 2012).

A MICA-nal végzett kísérleteinkben a MIC értékek RPMI-1640 tápközegben a módosított érzékenységi határértéken belül mozogtak (Pfaller és mtsai. 2011b). Humán szérum

jelenlétében az értékek a 4-128x-ára emelkedtek. Hasonló eredményt kaptak Odabasi és munkatársai (2007), akik 32-256x-os MIC növekedést tapasztaltak, míg Paderu és munkacsoportjánál (2007) ez az arány 32-128x-os volt a különböző *Candida* fajok esetében.

A MICA az irodalmi adatoknak megfelelően hatékony volt 50% humán szérumban jelenlétében az összes vizsgált *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* és *C. inconspicua* izolátumokkal szemben ≤ 4 mg/l koncentráción (Odabasi és mtsai. 2007, Paderu és mtsai. 2007). Habár ezt, a szérumban és a szövetekben is elérhető átlagos MICA koncentrációt a klinikumban elfogadott, 100 mg/kg napi dózis alkalmazásával nem biztos, hogy elérjük (Hiemenz és mtsai. 2005, Undre és mtsai. 2012), az emelt, 150 mg/kg/nap gyógyszerdózis már hatékony vér és szöveti MICA szintet biztosíthat (Goto és mtsai. 2010, Yamada és mtsai. 2011).

A *C. krusei* kevésbé tűnt érzékenynek MICA iránt az *in vitro* kísérletek során, mivel fungisztikus hatás csak ≥ 16 mg/l-n fordult elő, ami arra enged következtetni, hogy a 150 mg/kg/nap dózis sem elegendő *C. krusei* által kiváltott candidiázis során. Néhány esetben azonban beszámoltak terápiás sikerről normál dóziséű echinocandin kezelés után (Pappas és mtsai. 2007, Pfaller és mtsai. 2011b).

A jelenlegi és a régebbi eredmények is azt mutatják, hogy *C. parapsilosis* által okozott invazív candidiázis kezelésére az echinocandinok nem az elsőként ajánlott antifungális szerek (Chen és mtsai. 2011). Mégis az emelt napi dózis megfelelően magas gyógyszer csúcskoncentrációt (C_{max}) eredményezhet szérumban. Száz milligramm napi MICA dózis esetében a C_{max} az első és hetedik napon 7,1 mg/l, illetve 22 mg/l, a 200 mg dóziséű pedig 13,1 mg/l és 22,6 mg/l a gyógyszer csúcskoncentrációja (Goto és mtsai. 2010, Hiemenz és mtsai. 2005, Undre és mtsai. 2012), ami magyarázata lehet a klinikumban a normál vagy emelt dóziséű echinocandin terápiák sikerességére még *C. parapsilosis* ellen is (Betts és mtsai. 2009, Pappas és mtsai. 2007, Pfaller és mtsai. 2011b).

Emellett a faj csökkent virulenciája a többi *Candida* fajjal összehasonlítva szintén fontos szerepet játszhat az echinocandinok hatásosságában. Ennek ellenére szoros összefüggést vélnek felfedezni az echinocandin használat és a *C. parapsilosis* fertőzés során létrejött candidémia újbóli megjelenésével (Kabbara és mtsai. 2008, Pfeiffer és mtsai. 2010).

A *C. orthopsilosis* hasonló tulajdonságokat mutatott, mint a *C. parapsilosis*, míg a *C. metapsilosis* izolátumok esetében már 1-8 mg/l koncentráción fungisztikus hatás volt

megfigyelhető. Ezt alátámasztja Spreghini és munkacsoportjának (2012) kísérlete is, akik a 'psilosis csoport' három tagja közül a *C. metapsilosis*-t találták a legérzékenyebbnek MICA-ra. Idő-ölés kísérletek során szérumban jelenlétében még fungicid hatást is tapasztaltak ezen izolátumoknál. Kísérleteinkben szintén a *C. metapsilosis* reagált jobban a gyógyszerre, de csak erős fungisztikus hatás volt megfigyelhető, ami a MICA-ra érzékeny fajok eredményeihez hasonló, annak ellenére, hogy a *C. parapsilosis sensu lato* csoportnak mindhárom tagja ugyanazon aminosavcserével rendelkezik az FKS alegységben (Garcia-Effron és mtsai. 2008).

A CAS-nal végzett tanulmány során az idő-ölés kísérlet hasznos módszernek bizonyult a PG vizsgálatára NIK és humán szérumban jelenlétében. A kísérlet során PG RPMI-1640 tápközegben a *C. albicans*, *C. tropicalis*, két *C. parapsilosis* és egy *C. orthopsilosis* izolátumok esetében volt tapasztalható olyan gyógyszerkoncentrációkon (kivéve a 3 *C. tropicalis* izolátumot), melyek normál dozírozási stratégia mellett a humán szérumban is elérhetőek (12,1 mg/l) (Stevens és mtsai. 2004).

A kitin szintézis gátló NIK MIC meghatározása során a legmagasabb, 8 mg/l koncentráció sem hozott prominens gátlást *C. tropicalis* és *C. glabrata* izolátumok esetében, míg a többi fajnál elég széles skálán mozogtak a MIC értékek (0,25-8 mg/l). Ezek az eredmények hasonlóak Li és munkacsoportjának (1999) eredményeihez, melyben a NIK *C. glabrata*, *C. krusei* és *C. tropicalis* esetében hatástalan volt, míg *C. albicans*-nál 0,5-32 mg/l illetve *C. parapsilosis*-nál 1-4 mg/l között változtak a MIC értékek.

A CAS + NIK kombináció alkalmazása megszüntette a PG-t az összes olyan izolátumnál, melyek a CAS-nal végzett idő-ölés kísérlet során magas gyógyszerkoncentrációban növekedést mutattak. Ez a hatás gyakran még a NIK, MIC alatti koncentrációin is megfigyelhető volt. Az irodalomban leírtakkal megegyezően a kísérlet során a NIK fokozta a CAS aktivitását azon izolátumok esetében, melyeknél PG nem volt tapasztalható (Sandovsky-Losica és mtsai. 2008), habár a vizsgálatok során nem az idő-ölés görbéket használták a kombinációs kísérletek során. Munkánkban szinergista hatás volt megfigyelhető egyes *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* és *C. parapsilosis* izolátumoknál CAS + NIK kombináció alkalmazásánál.

A szérumban végzett mikrodilúciós kísérletek során a MIC értékek 2-16-szorosára emelkedtek RPMI-1640-hez képest, ami megfelel a korábbi megfigyeléseknek, ahol 1-16-szoros volt a MIC növekedés (Odabasi és mtsai. 2007, Paderu és mtsai. 2007).

Tizenhatszoros MIC változás a *C. parapsilosis* és a *C. glabrata* izolátumoknál volt megfigyelhető.

Ötven százalék humán szérumot tartalmazó tápközegben a PG megszűnt, ezzel szemben fontos megjegyezni, hogy a CAS hatékonysága jelentősen lecsökkent az összes vizsgált *Candida* faj esetében. A gyógyszer ezen aktivitásváltozása valószínűleg a 96,5%-os fehérjekötő képesség miatt jelentkezhet (Chen és mtsai. 2011, Migoya és mtsai. 2011), habár feltételezik, hogy a szérumfehérjékhez kötött echinocandinok egy része aktív marad a *Candida* fajok ellen (Garcia-Effron és mtsai. 2011).

Szérummal kiegészített RPMI-1640-ben már 1 mg/l CAS koncentráción erős fungisztatikus vagy fungicid hatás érvényesült a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* és *C. dubliniensis* fajok ellen. *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* izolátumok esetében csak a 16-32 mg/l CAS mutatott aktivitást, míg a *C. parapsilosis*-szal szemben csupán gyenge fungisztatikus hatás volt megfigyelhető. CAS + NIK kombináció csak *C. albicans* 10920 és 17433, illetve *C. tropicalis* 555 izolátumok esetében okozott szinergista hatást az alacsonyabb CAS koncentrációértékeknél. A többi törzs esetében nem változott jelentősen a gombaszám a kombináció alkalmazásával RPMI-1640 + 50% szérum közegben.

Habár a szérummal kiegészített tápközegben végzett érzékenységi vizsgálatok jobban utánozzák az emberi szervezetben zajló folyamatokat, emellett pedig könnyebben el lehet különíteni az FKS mutánsokat a vad típustól (Arendrup és mtsai. 2011, Garcia-Effron és mtsai. 2011), csupán néhány MIC meghatározást végeztek eddig humán vagy szarvasmarha szérummal (Ernst és mtsai. 2002a, Ishikawa és mtsai. 2009, Odabasi és mtsai. 2007, Paderu és mtsai. 2007). Ennek ellenére a nemzetközi centrumokban történő összehasonlító vizsgálatok a kétféle tápközeg esetében eddig még nem történtek meg. Ahogy a MIC eredmények mutatják, a gombák érzékenysége közvetlenül függ a szérum jelenlététől (Ernst és mtsai. 2002a), viszont a kísérletekben használható szérum koncentráció mennyisége még nem tisztázott. A humán szérum alkalmazásának problémái miatt (egészségügyi veszélyek, a használata körüli viták) előtérbe kerülhet a szarvasmarha szérum, mely 50 mg/ml koncentrációban hasonló eredményt produkál, mint az 50% humán szérum (Garcia-Effron és mtsai. 2011).

Az *in vitro* antifungális érzékenységi vizsgálatok célja, hogy standardizált körülmények között meghatározzák az adott antifungális szer hatékonyságát a betegekből izolált kórokozó gombák ellen. Szerencsés esetben pontos adatok vannak a betegek

alapbetegségéről, az alkalmazott antifungális szerekről és azok dózisáról is. Így, a kapott adatok segítséget nyújtanak abban, hogy a standardizált, MIC meghatározási módszerek alapján a kapott eredmények által meg tudjuk jósolni az adott antifungális szer hatékonyságát. Így születtek meg azok a „határértékek” a különböző antifungális szerek iránt, amelyek alapján az adott kórokozó az érzékeny vagy a rezisztens kategóriákba tartozik az adott antifungális szerrel szemben (CLSI 2008a, CLSI 2008b, NCCLS 1992, NCCLS 2002). Mindazonáltal, a halálozási arány nem csökkent jelentősen az új határértékek bevezetésével (Pfaller és mtsai. 2004b, Pfaller és mtsai. 2007, Chen és mtsai. 2011).

Az invazív gombafertőzések kimenetelét döntően a kórokozó virulenciája, az alapbetegség és a fehérvérsejtek száma határozza meg. Az *in vitro* farmakodinámiás vizsgálatok szerepet játszanak az adott MIC értékkel rendelkező kórokozó gátlásában vagy előlésében a kérdéses antifungális szer esetén. Ismerve a gombaellenes szer farmakokinetikáját (humán vagy kísérletes állatmodellek által) lehetőség van arra, hogy a gyógyszeres terápia tervezésével az invazív gonbafertőzés kezelése még eredményesebb legyen (Andes és mtsai. 2008, Andes és mtsai. 2011, Smith és mtsa. 2008). Minezen erőfeszítések ellenére, nagy lehet a diszkrepancia az *in vitro* érzékenynek minősülő kórokozó kezelése és a végkimenetel között. A terápiás sikertelenségek jelenlegi magas száma vezetett az utóbbi 1-2 évben a fajspecifikus határértékek bevezetéséhez (Pfaller és mtsai. 2010, Pfaller és mtsai. 2011b, Pfaller és mtsai. 2011a, Pfaller és mtsai. 2012). Hogy ezen, határértékeknek a bevezetése mennyire fogja a betegek túlélését (gyógyulását) javítani, még nem tudjuk.

A humán szérummal végzett vizsgálataink eredményei tovább javíthatják a betegek gyógyulási esélyeit, mivel világosan mutatják a két, általunk vizsgált echinocandin esetén, hogy a szérumban csökken az antifungális hatás. Ez mindenképpen azt jelzi, hogy nagyobb echinocandin dózisok valószínűleg jobb terápiás hatást eredményeznek, bár ez a stratégia sokkal több anyagi ráfordítással jár. *In vitro* eredményeink alapján megfelelő dozírozással elérhetjük azt az AUC vagy C_{max} értékeket, ami alapján sikerülhet a kórokozó eradikálása a betegekből (Andes és mtsai. 2008, Andes és mtsai 2011, Chen és mtsai. 2011). A szérummal végzett vizsgálatok eredményeinek a felhasználása a határértékek jövőbeli, esetleges módosításánál fontosnak tűnik.

7. Összefoglalás

A kísérletek során két echinocandin, a micafungin és a caspofungin *in vitro* aktivitását tanulmányoztuk a klinikailag fontos *Candida* fajokkal szemben RPMI-1640, illetve 50% humán szérummal kiegészített tápközegben, mikro- és makrodilúciós módszerekkel. Ugyancsak vizsgáltuk a nikkomycin Z-nek és a szérumnak a hatását caspofungin esetén paradox növekedést mutató és paradox növekedést nem mutató *Candida* izolátumok esetén.

Micafungin esetén a MIC értékek közelítettek, vagy néhány faj esetében jóval az újonnan bevezetett érzékenységi határérték felé emelkedtek szérumos tápközegben. Elsőként alkalmaztuk az idő-ölés görbék felvételét a micafungin terápiás hatásának a megbecsülésére 50% szérum jelenlétében. Vizsgálataink alapján az olyan magas micafungin koncentráción gátolható gombák, mint a *C. parapsilosis*, a *C. orthopsilosis* vagy a *C. krusei* nagyobb napi dózisu terapiát igényelhetnek.

A caspofunginnal végzett vizsgálatok során az idő-ölés görbék alkalmazásával először bizonyítottuk, hogy a nikkomycin Z illetve 50% humán szérum alkalmazása megszünteti a néhány *Candida* fajnál észlelt paradox növekedést. Bár a paradox növekedés csupán egy *in vitro* tapasztalható jelenségnek tűnik, a nikkomycin Z-vel kapott eredményeink egyrészt segíthetnek az echinocandinok által indukált stressz-adaptációs folyamatok pontosabb megértésében. Másrészt, bár a nikkomycin Z még mindig egy klinikai kutatás alatt álló antifungális szer, más gyógyszerekkel való kombinációja sikeres lehet a mikózisok kezelésében, mivel kísérleteinkben több *Candida* fajjal szemben szinergista hatást mutatott a caspofungin kombinációja a nikkomycin Z-vel.

A humán szérummal végzett vizsgálataink eredményei tovább javíthatják a betegek gyógyulási esélyeit, mivel világosan mutatják a két, általunk vizsgált echinocandin esetén, hogy a szérumban csökken az antifungális hatás. Ez mindenképpen azt jelzi, hogy nagyobb echinocandin dózisok valószínűleg jobb terápiás hatást eredményeznek, bár ez a stratégia sokkal több anyagi ráfordítással jár. Az általunk kapott eredményeket állatkísérletekben kell a közeljövőben megerősíteni.

8. Summary

During the tests we studied the *in vitro* activity of two echinocandins (micafungin and caspofungin) against the clinically relevant *Candida* species in RPMI-1640 and in 50% human serum supplemented RPMI-1640 medium with help of micro- and macrodilution methods. The effects of nikkomycin Z and human serum were investigated in case of using caspofungin against those isolates which showed or not paradoxical growth.

Reduced micafungin and caspofungin efficacy were observed in presence of 50% human serum in terms of results against the clinically relevant *Candida* species. In the case of micafungin the MIC values closed or raised above the clinical breakpoints in presence of serum. First time-kill studies were applied to estimate the therapeutic efficacy of micafungin in 50% human serum. In base of our studies fungi which can be inhibited by high concentration of micafungin may required higher daily dosage therapy such as *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* or *C. krusei*.

During our studies of caspofungin we convinced first paradoxical growth is eliminated by nikkomycin Z and 50% human serum against several *Candida* species using time-kill curves. However the paradoxical growth seems to be only an *in vitro* phenomenon, our results of nikkomycin Z on the one hand may help a clearer understanding the echinocandin induced stress adaptation pathways. On the other hand nikkomycin Z is currently in clinical trial for its antifungal activity, the combination of NIK with other drugs may success in the treatment of mycoses. The combination of caspofungin with nikkomycin Z showed synergistic effect against several *Candida* species in our investigation.

Our results gained by using human serum may further improve the chances of these patients to recover from their disease since in case of the two echinocandins investigated, antifungal effects were found to be decreased in the presence of human serum. This inevitably implies that higher echinocandin doses would probably result in improved therapeutic effects; however, this strategy requires more investment. Our results should have to confirm by animal attempts.

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni elsősorban témavezetőmnek, dr. Majoros Lászlónak, hogy érdeklődésemet felkeltette ezen kutatási témában, hasznos tanácsaival, útmutatásával segítségemre volt és munkámat mindig támogatta.

Köszönöm Gergely Lajos Professzor Úrnak, valamint dr. Kónya Józsefnek, hogy intézetükben lehetővé tették számomra a Ph. D. tanulmányt, valamint a kísérletes munkát.

Külön köszönetemet szeretném kinyilvánítani Pappné Falusi Erzsébetnek, Sóczó Georginának, Szilágyi Juditnak és Kovács Renátónak a nélkülözhetetlen munkájukért és segítségükért.

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, barátaimnak kitartásukért, támogatásukért, ösztönző magatartásukért.

Köszönet illeti a Richter Gedeon gyógyszergyárat, akik a tanulmányaimat támogatták.

A kísérletek a TÁMOP 4.2.1./B-09/I/KONV-2010-0007 pályázat által valósultak meg.

10. Irodalomjegyzék

Albrecht A, Felk A, Pichova I, Naglik JR, Schaller M, de Groot P, Maccallum D, Odds FC, Schäfer W, Klis F, Monod M, Hube B. 2006. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and hostpathogen interactions. *J. Biol. Chem.* 281, 688–694.

Andes D, Ambrose PG, Hammel JP, Van Wart SA, Iyer V, Reynolds DK, Buell DN, Kovanda LL, Bhavnani SM. 2011. Use of pharmacokinetic-pharmacodynamic analyses to optimize therapy with the systemic antifungal micafungin for invasive candidiasis or candidemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(5):2113-21.

Andes D, Diekema DJ, Pfaller MA, Prince RA, Marchillo K, Ashbeck J, Hou J. 2008. *In vivo* pharmacodynamic characterization of anidulafungin in a neutropenic murine candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(2):539-50.

Arendrup MC, Rodriguez-Tudela JL, Park S, Garcia-Effron G, Delmas G, Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Perlin DS. 2011. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* spp. Using EUCAST EDef 7.1 and CLSI M27-A3 standard procedures: analysis of the influence of bovine serum albumin supplementation, storage time, and drug lots. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(4):1580-7.

Bachman, SP., TF. Patterson, and J. Lopez-Ribot. 2002. In vitro activity of caspofungin (MK-0991) against *Candida albicans* clinical isolates displaying different mechanisms of azole resistance. *J. Clin. Microbiol.* 40:2228-2230.

Baily, GG., CB. Moore, SM. Essayag, S. de Wit, JP. Burnie, and DW. Denning. 1997. *Candida inconspicua*, a fluconazole-resistant pathogen in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* 25:161–162.

Bal AM. 2010. The echinocandins: three useful choices or three too many? *Int J Antimicrob Agents.* 35(1):13-8.

Balashov, SV., S. Park, and DS. Perlin. 2006. Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in *FKSI*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:2058-2063.

Bennett JE. 2006. Echinocandins for candidemia in adults without neutropenia. *N Engl J Med.* 355(11):1154-9.

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. 2009. 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.* 48:1676–1684.

Birch M, Robson G, Law D, Denning DW. 1996. Evidence of multiple extracellular phospholipase activities of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 64, 751–755.

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

Blankenship JR, Wormley FL, Boyce MK, Schell WA, Filler SG, Perfect JR, Heitman J. 2003. Calcineurin is essential for *Candida albicans* survival in serum and virulence. *Eukaryot. Cell* 2(3): 422–430.

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

Cantón, E., J. Pemán, M. Gobernado. 2004. Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2477-2482.

Carlisle PL, Banerjee M, Lazzell A, Monteagudo C, López-Ribot JL, Kadosh D. 2009. Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:599–604.

Chamilos G., Russell E. Lewis, Nathaniel Albert, and Dimitrios P. Kontoyiannis. 2007. Paradoxical Effect of Echinocandins across *Candida* Species *In Vitro*: Evidence for Echinocandin-Specific and *Candida* Species-Related Differences. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(6): 2257–2259.

- Chandrasekar PH, Sobel JD. 2006. Micafungin: a new echinocandin. *Clin Infect Dis.* 42: 1171-8.
- Chapman T., Kinsman O., Houston J. 1992. Chitin biosynthesis in *Candida albicans* grown *in vitro* and *in vivo* and its inhibition by nikkomycin Z. *Antimicrob Agents Chemother.* 36(9):1909-14.
- Chen C.-A Sharon., Monica A. Slavin and Tania C. Sorrell. 2011. Echinocandin Antifungal Drugs in Fungal Infections A Comparison. *Drugs.* 71(1):11-41.
- Chiou CC, Groll AH, Walsh TJ. 2000. New drugs and novel targets for treatment of invasive fungal infections in patients with cancer. *Oncologist.* 5(2):120-35.
- Choi HW, Shin JH, Jung SI, Park KH, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. 2007. Species-specific differences in the susceptibilities of biofilms formed by *Candida* bloodstream isolates to echinocandin antifungals. *Antimicrob Agents Chemoter.* 51(4):1520-3.
- Cleary JD, Rogers PD, Chapman SW. 2003. Variability in polyene content and cellular toxicity among deoxycholate amphotericin B formulations. *Pharmacotherapy.* 23(5):572-578.
- Clemons KV, Espiritu M, Parmar R, Stevens DA. 2006. Assessment of the paradoxical effect of caspofungin in therapy of candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(4): 1293-7.
- CLSI. 2008a. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. Document M27-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- CLSI. 2008b. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard CLSI document M38-A2. Wayne, PA.
- Colombo, AL., M. Nucci, R. Salomao, MLM. Branchini, R. Richtmann A. Derossi, and SB. Wey. 1999. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 34:281–286.

Cowen LE. 2009. Hsp90 orchestrates stress response signaling governing fungal drug resistance. *PLoS Pathog.* 5(8):e1000471.

Cramer RA Jr, Perfect BZ, Pinchai N, Park S, Perlin DS, Asfaw YG, Heitman J, Perfect JR, Steinbach WJ. 2008. Calcineurin target CrzA regulates conidial germination, hyphal growth, and pathogenesis of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* 7(7): 1085–1097.

D'Antonio, D., B. Violante, A. Mazzoni, T. Bonfini, MA. Capuani, F. D'Aloia, A. Iacone, F. Schioppa, and F. Romano. 1998. A nosocomial cluster of *Candida inconspicua* infections in patients with hematological malignancies. *J. Clin. Microbiol.* 36:792–795.

de Wet N, Llanos-Cuentas A, Suleiman J, Baraldi E, Krantz EF, Della Negra M, Diekmann-Berndt H. 2004. A randomized, double-blind, parallel-group, dose-response study of micafungin compared with fluconazole for the treatment of esophageal candidiasis in HIV-positive patients. *Clin Infect Dis.* 39(6): 842–9.

Delma ST., Patricia LC. and David K. 2011. Coevolution of Morphology and Virulence in *Candida* Species. *Eukaryot cell.* 10(9): 1173–1182.

Denning, DW. 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet.* 362:1142-1151.

Diasio RB, Bennett JE, Myers CE. 1978. Mode of action of 5-fluorocytosine. *Biochem Pharmacol.*; 27(5):703-707.

Dodds Ashley ES., R. Lewis, JS. Lewis, C. Martin, and D. Andes. 2006. Pharmacology of systemic antifungal agents. *Clin. Infect. Dis.* 43(Suppl. 1):S28-S39.

Dupont B. 2002. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.* 49 (Suppl.S1): 31-36.

Dutcher JD. The discovery and development of amphotericin B. 1968. *Dis Chest.*;54(suppl 1):296-298.

Eagle H, Musselman AD. 1948. The rate of bactericidal action of penicillin *in vitro* as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. *J Exp Med* 88:99–131.

Ernst EJ, Roling EE, Petzold CR, Keele DJ, Klepser ME. 2002a. In vitro activity of micafungin (FK-463) against *Candida* spp.: microdilution, time-kill, and postantifungal-effect studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(12):3846-53.

Ernst, EJ., K. Yodoi, EE. Roling. 2002b. Rates and extents of antifungal activities of amphotericin B, flucytosine, fluconazole, and voriconazole against *Candida lusitanae* determined by microdilution, Etest, and time-kill methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:578-581.

Fukuoka, T., DA. Johnston, CA. Winslow, MJ. de Groot, C. Burt, CA. Hitchcock, and SG. Filler. 2003. Genetic basis for differential activities of fluconazole and voriconazole against *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1213–1219.

Ganesan LT, Manavathu EK, Cutright JL, Alangaden GJ, Chandrasekar PH. 2004. *In vitro* activity of nikkomycin Z alone and in combination with polyenes, triazoles or echinocandins against *Aspergillus fumigatus*. *Clin Microbiol Infect.* 10(11):961-6.

Garcia-Effron G, Katiyar SK, Park S, Edlind TD, Perlin DS. 2008. 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.* 52(7):2305-12.

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

Garcia-Effron G, Park S, Perlin DS. 2011. 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.* 55(5):2245-55.

Gauwerky K, Borelli C, Korting HC. 2009. Targeting virulence: a new paradigm for antifungals. *Drug Discov Today.* 14(3-4):214-22.

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

- Ghannoum, MA. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 122–143.
- Ghannoum, MA., LB. Rice. 1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *J. Clin. Microbiol.* 12:501-517.
- Glöckner A., Steinbach A., Vehreschild JJ., Cornely OA. 2008. Treatment of invasive candidiasis with echinocandins. *Mycosis.* 52: 476-486.
- Goto N, Hara T, Tsurumi H, Ogawa K, Kitagawa J, Kanemura N, Kasahara S, Yamada T, Shimizu M, Nakamura M, Matsuura K, Moriwaki H. 2010. Efficacy and safety of micafungin for treating febrile neutropenia in hematological malignancies. *Am J Hematol.* 85(11):872-6.
- Gow NA, Perera TH, Sherwood-Higham J, Gooday GW, Gregory DW, Marshall D. 1994. Investigation of touch-sensitive responses by hyphae of the human pathogenic fungus *Candida albicans*. *Scanning Microsc.* 8(3):705–710.
- Gow NA., Brown AJ., Odds FC. 2002. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:366–371.
- Groll AH, Piscitelli SC, Walsh TJ. 1998. Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: a comprehensive review of agents in clinical use, current investigational compounds, and putative targets for antifungal drug development. 1998. *Adv Pharmacol.*44:343-500.
- Hall GS, Myles C, Pratt KJ, Washington JA. 1988. Cilofungin (LY121019), an antifungal agent with specific activity against *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 32:1331–1335.
- Hazen, KC., JG. Wu, and J. Masuoka. 2001. Comparison of the hydrophobic properties of *Candida albicans* and *Candida dubiliensis*. *Infect. Immun.* 69:779-786.
- Hector RF. 1993. Compounds active against cell walls of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev.*6(1):1-21.

Hernandez, S., JL. Lopez-Ribot, LK. Najvar, DI. McCarthy, R. Bocanegra, and JR. Graybill. 2004. Caspofungin resistance in *Candida albicans*: correlating clinical outcome with laboratory susceptibility testing of three isogenic isolates serially obtained from a patient with progressive *Candida* esophagitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1382-1383.

Hiemenz J, Cagnoni P, Simpson D, Devine S, Chao N, Keirns J, Lau W, Facklam D, Buell D. 2005. Pharmacokinetic and maximum tolerated dose study of micafungin in combination with fluconazole versus fluconazole alone for prophylaxis of fungal infections in adult patients undergoing a bone marrow or peripheral stem cell transplant. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(4):1331-6.

Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, Marr KA, Pfaller MA, Chang CH, Webster KM. 2009. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis.* 48(12):1695-703.

Imtiaz T, Lee KK, Munro CA, Maccallum DM, Shankland GS, Johnson EM, Macgregor MS, Bal AM. 2012. Echinocandin resistance due to simultaneous FKS mutation and increased cell wall chitin in a *Candida albicans* bloodstream isolate following brief exposure to caspofungin. *J Med Microbiol.* 61(Pt 9):1330-4..

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

Kabbara N, Lacroix C, Peffault de Latour R, Socié G, Ghannoum M, Ribaud P. 2008. Breakthrough *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii* blood stream infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients receiving long-term caspofungin therapy. *Haematologica.* 93(4):639-40.

Kao, AS., ME. Brandt, WR. Pruitt, LA. Conn, BA. Perkins, DS. Stephens, WS. Baughman, AL. Reingold, GA. Rothrock, MA. Pfaller, RW. Pinner, and RA. Hajjeh. 1999. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin. Infect. Dis.* 29:1164–1170.

- Katiyar, S., M. Pfaller, and E. Edlind. 2006. Characterization of *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:2892-2894.
- Kim J, Sudbery P. 2011. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J. Microbiol.* 49(2):171-7.
- Kim MK, Park HS, Kim CH, Park HM, Choi W. 2002. Inhibitory effect of nikkomycin Z on chitin synthases in *Candida albicans*. *Yeast.* 19(4):341-9.
- Kiraz N, Dag I, Yamac M, Kiremitci A, Kasifoglu N, Oz Y. 2010. Synergistic activities of three triazoles with caspofungin against *Candida glabrata* isolates determined by time-kill, Etest, and disk diffusion methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(5):2244-7.
- Klepser, ME., EJ. Ernst, RE. Lewis, ME. Ernst, MA. Pfaller. 1998. Influence of test conditions on antifungal time kill-curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:1207-1212.
- Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, Walsh TJ, Ito J, Andes DR, Baddley JW, Brown JM, Brumble LM, Freifeld AG, Hadley S, Herwaldt LA, Kauffman CA, Knapp K, Lyon GM, Morrison VA, Papanicolaou G, Patterson TF, Perl TM, Schuster MG, Walker R, Wannemuehler KA, Wingard JR, Chiller TM, Pappas PG. 2010. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis.* 50(8):1091-100.
- Kontoyiannis DP., Lewis RE. 2002. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet.* 359(9312):1135-44.
- Kontoyiannis, DP., I. Vaziri, HA. Hanna, M. Boktour, J. Thornby, R. Hachem, GP. Bodey, and II. Raad. 2001. Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. *Clin. Infect. Dis.* 33:1676-1681.
- Krogh-Madsen, M., MC. Arendrup, L. Heslet, and JD. Knudsen. 2006. Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. *Clin. Infect. Dis.* 42:938-944.

- Kumamoto CA., Vences M.D. 2005. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol.* 7:1546–1554.
- Kuse ER, Chetchotisakd P, da Cunha CA, Ruhnke M, Barrios C, Raghunadharao D, Sekhon JS, Freire A, Ramasubramanian V, Demeyer I, Nucci M, Leelarasamee A, Jacobs F, Decruyenaere J, Pittet D, Ullmann AJ, Ostrosky-Zeichner L, Lortholary O, Koblinger S, Diekmann-Berndt H, Cornely OA; Micafungin Invasive Candidiasis Working Group. 2007. Micafungin versus liposomal amphotericin B for candidaemia and invasive candidosis: a phase III randomised double-blind trial. *Lancet.* 369; 1519–1527.
- Laverdiere, M., RG. Lalonde, JG. Baril, DC. Sheppard, S. Park, and DS. Perlin. 2006. Progressive loss of echinocandin activity following prolonged use for treatment of *Candida albicans* oesophagitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 57:705-708.
- Levin, AS., SF. Costa, NS. Mussi, M. Basso, SI. Sinto, C. Machado, C. Geiger, MC. Villares, AZ. Schreiber, AA. Barone, and ML. Branchini. 1998. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semiimplantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 30:243–249.
- Lewis RE. Current concepts in antifungal pharmacology. 2011. *Mayo Clin Proc.* 86(8):805-17.
- Lewis, RE., ME. Klepser, M. Pfaller. 2000. In vitro pharmacodynamic characteristics of flucytosine determined by time-kill methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 36:101-105.
- Li RK, Rinaldi MG. 1999. *In vitro* antifungal activity of nikkomycin Z in combination with fluconazole or itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(6):1401-5.
- Louie A, Deziel M, Liu W, Drusano MF, Gumbo T, Drusano GL. 2005. Pharmacodynamics of caspofungin in a murine model of systemic candidiasis: importance of persistence of caspofungin in tissues to understanding drug activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(12):5058-68.
- Ludwig Endre, Szalka András: Infektológia.2009. Medicina könyvkiadó. Budapest.

Luo G, Ibrahim AS, Spellberg B, Nobile CJ, Mitchell AP, Fu Y. 2010. *Candida albicans* Hyr1p confers resistance to neutrophil killing and is a potential vaccine target. *J. Infect. Dis.* 201(11):1718–1728.

Maertens J, Raad I, Petrikos G, Boogaerts M, Selleslag D, Petersen FB, Sable CA, Kartsonis NA, Ngai A, Taylor A, Patterson TF, Denning DW, Walsh TJ; Caspofungin Salvage Aspergillosis Study Group. 2004. Efficacy and safety of caspofungin for treatment of invasive aspergillosis in patients refractory to or intolerant of conventional antifungal therapy. *Clin Infect Dis.* 39(11):1563-1571.

Majoros, L, Kardos G, Belák A, Maráz A, Asztalos L, Csánky E, Barta Z, Szabó B. 2003. 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.* 41(11):5250-3.

Majoros, L., G. Kardos, P. Feiszt, B. Szabó. 2005. Efficacy of amphotericin B and flucytosine against fluconazole-resistant *Candida inconspicua* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 56:253-254.

Marr, KA., K. Seidel, TC. White, and RA. Bowden. 2000. Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. *J. Infect. Dis.* 181: 309–316.

Martchenko M., Alarco AM., Harcus D., Whiteway M. 2004. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced *SOD5* gene. *Mol. Biol. Cell.* 15:456–467.

Martin, GS., DM. Mannino, S. Eaton, and M. Moss. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 348:1546–1554.

McCarthy PJ, Troke PF, Gull K. 1985. Mechanism of action of nikkomycin and the peptide transport system of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 131(4):775-80.

McClenny, NB., H. Fei, EJ. Baron, AC. Gales, A. Houston, RJ. Hollis, and MA. Pfaller. 2002. Change in colony morphology of *Candida lusitanae* in association with development of amphotericin B resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1325–1328.

- McNeil, MM., SL. Nash, RA. Hajjeh, MA. Phelan, LA. Conn, BD. Plikaytis, and DW. Warnock. 2001. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980–1997. *Clin. Infect. Dis.* 33:641–647.
- Migoya EM, Mistry GC, Stone JA, Comisar W, Sun P, Norcross A, Bi S, Winchell GA, Ghosh K, Uemera N, Deutsch PJ, Wagner JA. 2011. Safety and pharmacokinetics of higher doses of caspofungin in healthy adult participants. *J Clin Pharmacol.* 51(2):202-11.
- Mikamo, H, Y. Sato, T. Tamaya. 2000. In vitro antifungal activity of FK463, a new water-soluble echinocandin-like lipopeptide. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:485-487.
- Mirbod F, Banno Y, Ghannoum MA, Ibrahim AS, Nakashima S, Kitajima Y, Cole GT, Nozawa Y. 1995. Purification and characterization of lysophospholipasetransacylase (h-LPTA) from a highly virulent strain of *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1257(2): 181–188.
- Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, Colombo AL, Thompson-Moya L, Smietana J, Lupinacci R, Sable C, Kartsonis N, Perfect J; Caspofungin Invasive Candidiasis Study Group. 2002. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis *N Engl J Med.* 347(25): 2020–2029.
- Moudgal, V., T. Little, D. Boikov, and JA. Vazquez. 2005. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:767-769.
- Mukherjee PK, Chandra J. 2004. *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist Updat.* 7(4-5): 301-9.
- Munro CA, Winter K, Buchan A, Henry K, Becker JM, Brown AJ, Bulawa CE, Gow NA. 2001. Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol. Microbiol.* 39: 1414-1426.
- Naglik JR, Newport G, White TC, Fernandes-Naglik LL, Greenspan JS, Greenspan D, Sweet SP, Challacombe SJ, Agabian N. 1999. In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infect. Immun.* 67(5): 2482–2490.

Nantel A, Dignard D, Bachewich C, H Marcus D, Marcil A, Bouin AP, Sensen CW, Hogues H, van het Hoog M, Gordon P, Rigby T, Benoit F, Tessier DC, Thomas DY, Whiteway M. 2002. Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Mol. Biol. Cell.* 13(10): 3452–3465.

NCCLS 1992. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; proposed standard NCCLS document M27-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

NCCLS 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidialforming filamentous fungi. Approved standard NCCLS M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

Nix DE, Swezey RR, Hector R, Galgiani JN. 2009. Pharmacokinetics of nikkomycin Z after single rising oral doses. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(6):2517-21.

Nolte, FS., T. Parkinson, DJ. Falconer, S. Dix, J. Williams, C. Gilmore, R. Geller, and JR. Wingard. 1997. Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:196–199.

Nucci, M., E. Anaissie. 2001. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clin. Infect. Dis.* 33:1959-1967.

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

Ostrosky-Zeichner, L., JH. Rex, PG. Pappas, RJ. Hamill, RA. Larsen, HW. Horowitz, WG. Powderly, N. Hyslop, CA. Kauffman, J. Cleary, JE. Mangino, and J. Lee. 2003. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3149-3154.

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

Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, Kauffman CA, Hyslop N, Mangino JE, Chapman S, Horowitz HW, Edwards JE, Dismukes WE; NIAID Mycoses Study Group. 2003. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis.* 37(5): 634-43.

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. 2007. Micafungin versus caspofungin for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis.* 45(7):883-893.

Pappas, PG., JH. Rex, JD. Sobel, SG. Filler, WE. Dismukes, TJ. Waals, JE. Edwards. 2004. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* 38:161-189.

Petraitiene R, Petraitis V, Groll AH, Sein T, Schaufele RL, Francesconi A, Bacher J, Avila NA, Walsh TJ. 2002. Antifungal efficacy of caspofungin (MK-0991) in experimental pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits: pharmacokinetics, drug disposition, and relationship to galactomannan antigenemia. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(1): 12-23.

Pettengell K, Mynhardt J, Kluyts T, Lau W, Facklam D, Buell D; FK463 South African Study Group. 2004. Successful treatment of oesophageal candidiasis by micafungin: a novel systemic antifungal agent. *Aliment Pharmacol Ther.* 20: 475–81.

Pfaller MA, Andes D, Arendrup MC, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Alexander BD, Brown SD, Chaturvedi V, Fowler CL, Ghannoum MA, Johnson EM, Knapp CC, Motyl MR, Ostrosky-Zeichner L, Walsh TJ. 2011a. Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 70(3):330-43.

Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D; CLSI Subcommittee for Antifungal Susceptibility Testing. 2010. 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.* 13(6):180-95.

Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. 2008. *In vitro* susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J Clin Microbiol.* 46(1): 150-6.

Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, Arendrup MC, Brown SD, Lockhart SR, Motyl M, Perlin DS; CLSI Subcommittee for Antifungal Testing. 2011b. 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.* 14(3):164-76.

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

Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Canton E, Castanheira M, Cuenca-Estrella M, Diekema DJ, Fothergill A, Fuller J, Ghannoum M, Jones RN, Lockhart SR, Martin-Mazuelos E, Melhem MS, Ostrosky-Zeichner L, Pappas P, Pelaez T, Peman J, Rex J, Szeszs MW. 2012. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol.* 50(6):2040-6.

Pfaller MA., Diekema DJ., Messer SA., Boyken L., Hollis RJ., Jones RN. 2004a. *In vitro* susceptibilities of rare *Candida* bloodstream isolates to ravuconazole and three comparative antifungal agents. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 48(2): 101-5.

Pfaller, MA. 2005a. Antifungal susceptibility testing methods. *Curr. Drug Targets* 6: 929–943.

Pfaller, MA., DJ. Diekema, and DJ. Sheehan. 2006b. Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 19:435–447.

Pfaller, MA., DJ. Diekema, MG. Rinaldi, R. Barnes, B. Hu, AV. Veselov, N. Tiraboschi, E. Nagy, DL. Gibbs, and the Global Antifungal Surveillance Group. 2005b. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *J. Clin. Microbiol.* 43:5848–5859.

- Pfaller, MA., L. Boyken, RJ. Hollis, SA. Messer, S. Tendolkar, and DJ. Diekema. 2006a. *In vitro* susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. *J. Clin. Microbiol.* 44:760-763.
- Pfaller, MA., L. Boyken, SA. Messer, S. Tendolkar, RJ. Hollis, DJ. Diekema. 2004b. Evaluation of etest method using Mueller-Hinton agar with glucose and methylene blue for determining amphotericin B MICs for 4,936 clinical isolates of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 42:4977-4979.
- Pfeiffer CD, Garcia-Effron G, Zaas AK, Perfect JR, Perlin DS, Alexander BD. 2010. Breakthrough invasive candidiasis in patients on micafungin. *J Clin Microbiol.* 48(7): 2373-80.
- Poikonen, E., O. Lyytikäinen, V. J. Anttila, and P. Ruutu. 2003. Candidemia in Finland, 1995–1999. *Emerg. Infect. Dis.* 9:985–990.
- Popolo L., Gualtieri T., Ragni E., 2001. The yeast cell-wall salvage pathway., *Med. Mycol.* 39:(suppl):111-21.
- Reboli AC, Rotstein C, Pappas PG, Chapman SW, Kett DH, Kumar D, Betts R, Wible M, Goldstein BP, Schranz J, Krause DS, Walsh TJ; Anidulafungin Study Group. 2007. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. *N Engl J Med.* 356(24): 2472-2482.
- Rees, JR., RW. Pinner, RA. Hajjeh, ME. Brandt, and AL. Reingold. 1998. The epidemiological features of invasive mycotic infections in the San Francisco Bay Area, 1992–1993: results of a population-based laboratory active surveillance. *Clin. Infect. Dis.* 27: 1138–1147.
- Rex JH, Bennett JE, Sugar AM, Pappas PG, van der Horst CM, Edwards JE, Washburn RG, Scheld WM, Karchmer AW, Dine AP, és mtsai. 1994. A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. *N Engl J Med* 331(20): 1325-1330.
- Rex, JH., and MA. Pfaller. 2002. Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin. Infect. Dis.* 35: 982–989.

- Richet, H., P. Roux, C. Des Champs, Y. Esnault, A. Andreumont, and the French Candidemia Study Group. 2002. Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics. *Clin. Microbiol. Infect.* 8: 405–412.
- Romani, L., F. Bistonian, P. Pucetti. 2003. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:338-343.
- Sandovsky-Losica H., Shwartzman R., Lahat Y., Segal E. 2008. Antifungal activity against *Candida albicans* of nikkomycin Z in combination with caspofungin, voriconazole or amphotericin B. *J Antimicrob Chemother.* 62(3): 635-7.
- Sanglard D., Odds FC. 2002. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanism and clinical consequences, *Lancet Infect. Dis.* 2:73-85.
- Segal, BH., J. Kwon-Chung, TJ. Walsh, BS. Klein, M. Batiwalla, NG. Almyroudi, SM. Holland, and L. Romani. 2006. Immunotherapy for fungal infections. *Clin. Infect. Dis.* 42:507–515.
- Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. 1999. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev.* 12(1):40-79.
- Shields RK, Nguyen MH, Du C, Press E, Cheng S, Clancy CJ. 2011b. Paradoxical effect of caspofungin against *Candida* bloodstream isolates is mediated by multiple pathways but eliminated in human serum. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(6):2641-7.
- Shields RK., Nguyen MH., Press E., Clancy CJ. 2011a. Five-minute exposure to caspofungin results in prolonged post-antifungal effects and eliminates the paradoxical growth of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:3598-602.
- Shin, JH., SJ. Kee, MG. Shin, SH. Kim, DH. Shin, SK. Lee, SP. Suh, and DW. Ryang. 2002. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J. Clin. Microbiol.* 40:1244–1248.
- Smith J, Andes D. 2008. Therapeutic drug monitoring of antifungals: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Ther Drug Monit.* 30(2):167-72.

- Sóczó G, Kardos G, Varga I, Kelentey B, Gesztelyi R, Majoros L. 2007. *In vitro* study of *Candida tropicalis* isolates exhibiting paradoxical growth in the presence of high concentrations of caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(12): 4474-6.
- Somogyvari F, Doczi I, Serly J, Ahmad S, Nagy E. 2007. Rapid discrimination between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by using real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 58(3):367-9.
- Spellberg BJ., Filler SG., Edwards JE. 2006. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clinical Practise.* 42: 244-251.
- Spellberg, BJ., D. Johnston, QT. Phan, JE. Edwards, Jr., SW. French, AS. Ibrahim, SG. Filler. 2003. Parenchymal organ, and not splenic, immunity correlates with host survival during disseminated candidiasis. *Infect. Immun.* 71:5756-5764.
- Spreghini E, Orlando F, Tavanti A, Senesi S, Giannini D, Manso E, Barchiesi F. 2012. *In vitro* and *in vivo* effects of echinocandins against *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. *J Antimicrob Chemother.* XXX-XXX.
- Staib P., Morschhauser J. 2007. Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*—an enigmatic developmental programme. *Mycoses* 50:1–12.
- Stevens DA, Espiritu M, Parmar R. 2004. Paradoxical effect of caspofungin: reduced activity against *Candida albicans* at high drug concentrations. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(9):3407-11.
- Stevens DA., Ichinomiya M., Koshi Y., Horiuchi H. 2006. 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 Chemoter.* 50: 3160-3161.
- Sundstrom, P. 2002. Adhesins in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:353-357.
- Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol.* 43(1): 284-92.

Tortorano, AM., E. Biraghi, A. Astofi, C. Ossi, M. Tejada, C. Farina, S. Perin, C. Bonaccorso, C. Cavanna, A. Raballo, A. Grossi, and the FIMUA Candidemia Study Group. 2002. European Confederation of Medical Mycology (ECMM) prospective survey of candidaemia: report from one Italian region. *J. Hosp. Infect.* 51:297–304.

Trick, WE., SK. Fridkin, JR. Edwards, RA. Hajjeh, RP. Gaynes, and the National Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals. 2002. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989–1999. *Clin. Infect. Dis.* 35: 622–630.

Undre N, Stevenson P, Baraldi E. 2012. Pharmacokinetics of micafungin in HIV positive patients with confirmed esophageal candidiasis. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 37(1): 31-8.

Varga I., Sóczó G., Kardos G., Borbély A., Szabó Z., Kemény-Beke A., Majoros L. 2008. Comparison of killing activity of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. *J Antimicrob Chemother.* 62(6): 1466-1468.

Vermes, A., HJ. Guchelaar, J. Dankert. 2000. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J. Antimicrob. Chemother.* 46: 171-179.

Villanueva A., EG. Arathoon, E. Gotuzzo, RS. Berman, MJ. DiNubile, CA. Sable. 2001. A randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin for the treatment of candidal esophagitis. *Clin Infect Dis.* 33: 1529–1535.

Viscoli, C., C. Girmenia, A. Marinus, L. Collette, P. Martino, B. Vandercam, C. Doyen, B. Lebeau, D. Spence, V. Krcmery, B. De Pauw, F. Meunier, and the Invasive Fungal Infection Group of the EORTC. 1999. Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Clin. Infect. Dis.* 28: 1071–1079.

Walker LA, Munro CA, de Bruijn I, Lenardon MD, McKinnon A, Gow NA. 2008. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog.* 4(4): e1000040.

Warnock DW. 2007. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Jpn. J. Med. Mycol.* 48(1):1-12.

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

Wiederhold NP. 2007a. Attenuation of echinocandin activity at elevated concentrations: a review of the paradoxical effect. *Curr Opin Infect Dis.* 20: 574–578.

Wingard, JR. 1995. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin. Infect. Dis.* 20: 115–125.

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

Yamada N, Kumada K, Kishino S, Mochizuki N, Ohno K, Ogura S. 2011. Distribution of micafungin in the tissue fluids of patients with invasive fungal infections. *J Infect Chemother.* 17(5): 731-4.

Yang, YL., SY. Li, HH. Chang, and HJ. Lo. 2005. Susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species in TSARY 2002. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 51: 179–183.

Yoon, SA., JA. Vazquez, PE. Stefan, JD. Sobel, and RA. Akins. 1999. High-frequency, *in vitro* reversible switching of *Candida lusitanae* clinical isolates from amphotericin B susceptibility to resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 836–845.

11. Tárgyszavak – keywords

Echinocandinok, antifungális szerekkel szembeni érzékenységek, *Candida* fajok, humán szérum alapú érzékenységi eljárások, paradox növekedés, nikkomycin Z és caspofungin kombináció

Echinocandins, antifungal susceptibility, *Candida* strains, human serum based susceptibility testing, paradoxical growth, combination of nikkomycin Z and caspofungin

Iktatószám: DEENKÉTK/267/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Földi Richárd

Neptun kód: A6IM32

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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:2.528 (2011)
2. Szilágyi, J., **Földi, R.**, Sedigh, B., Kardos, G., Majoros, L.: Effect of nikkomycin Z and 50% human serum on the killing activity of high-concentration caspofungin against *Candida* species using time-kill methodology. *J. Chemother.* 24 (1), 18-25, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1179/1120009X12Z.0000000005>
IF:1.084 (2011)



További Közlemények

3. **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. Epub ahead of print (2012)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-012-9554-7>
IF:1.654 (2011)
4. Szilágyi, J., **Földi, R.**, Gesztelyi, R., Bayegan, S., Kardos, G., Juhász, B., Majoros, L.: Comparison of the kidney fungal burden in experimental disseminated candidiasis by species of the Candida parapsilosis complex treated with fluconazole, amphotericin B and caspofungin in a temporarily neutropenic murine model.
Chemotherapy. 58 (2), 159-164, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000337088>
IF:1.816 (2011)
5. Bayegan, S., Szilágyi, J., Kemény-Beke, Á., **Földi, R.**, Kardos, G., Gesztelyi, R., Juhász, B., Adnan, A., Majoros, L.: Efficacy of a single 6 mg/kg versus two 3 mg/kg caspofungin doses for treatment of disseminated candidiasis caused by Candida albicans in a neutropenic mouse model.
J. Chemother. 23 (2), 107-109, 2011.
IF:1.084

Összesített impakt faktor: 8.166

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 3.612

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

Debrecen, 2012.09.04



12. Függelék

Fontosabb előadások, poszterek

Varga I, Sóczó G, Kardos G, Majoros L., **Földi R.** A Caspofungin ölő hatásának összehasonlító vizsgálata RPMI-1640 és antibiotikum medium 3 közegben *Candida dubliniensis* törzsek esetén. DEOEC TDK Konferencia 2008 Debrecen

J. Szilágyi, **R. Földi**, S. Bayegan, G. Kardos, Á. Kemény-Beke, R. Gesztelyi, B. Juhász, A. Adnan, L. Majoros. Evaluation of the Etest method for determining micafungin MICs for 360 clinical isolates of ten *Candida* species. MMT konferencia 2010. Keszthely

Richárd Földi, Judit Szilágyi, Gábor Kardos, Réka Berényi, Renátó Kovács, László Majoros. Effect of 50% human serum on the killing activity of micafungin against eight *Candida* species using time-kill methodology. 2nd Joint Workshop of ÖGMM, ÖGACH, ÖGIT & ÖGHMP, 2011. Vienna

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 Joint Workshop of ÖGMM, ÖGACH, ÖGIT & ÖGHMP, 2011. Vienna

Földi Richárd, Berényi Réka, Domán Marianna, Szilágyi Judit, Kovács Renátó, Kardos Gábor és Majoros László: A micafungin antifungális hatása 50% humán szérum jelenlétében nyolc *Candida* faj ellen az idő-ölés görbék felvétele esetében. V. Magyar Mikológiai Konferencia. 2012. Budapest