

# **EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS**

***CANDIDA PARAPSILOSIS SENSU STRICTO,  
CANDIDA ORTHOPSILOSIS ÉS CANDIDA METAPSILOSIS  
IZOLÁTUMOK ANTIFUNGÁLIS ÉRZÉKENYSÉGÉNEK IN VITRO ÉS  
IN VIVO VIZSGÁLATA***

**Szilágyi Judit**

**Témavezető: Dr. Majoros László**



**DEBRECENI EGYETEM**

**GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2012**

# Tartalomjegyzék

<b>Fontosabb rövidítések .....</b>	<b>4</b>
<b>I. Bevezetés .....</b>	<b>6</b>
<b>II. Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>8</b>
II.1. A <i>Candida</i> fajok által okozott megbetegedések általános jellemzése .....	8
II.2. A <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida tropicalis</i> és <i>Candida krusei</i> fajok epidemiológiája .....	10
II.3. A <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> , <i>Candida orthopsilosis</i> és <i>Candida metapsilosis</i> jellemzése .....	13
II.4. Antifungális terápia .....	20
II.4.1. Poliének .....	21
II.4.2. Azol típusú antifungális szerek .....	22
II.4.3. Echinocandinok .....	25
II.4.4. 5-fluorocytoszín .....	27
II.5. Az antifungális érzékenység meghatározása .....	29
II.5.1. <i>In vitro</i> módszerek .....	29
II.5.2. Antifungális érzékenységi kategóriák .....	30
<b>III. Célkitűzések .....</b>	<b>36</b>
<b>IV. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>37</b>
IV.1. A sarjadzó gombák eredete .....	37
IV.2. <i>In vitro</i> érzékenységi vizsgálatok .....	38
IV.2.1. A minimális gátló koncentráció meghatározása .....	38
IV.2.1.1. Az adatok értékelése .....	39
IV.2.2. E-teszt .....	39
IV.2.3. Az idő-ölés görbék felvétele .....	39
IV.2.3.1. Az adatok értékelése .....	40
IV.3. <i>In vivo</i> érzékenységi vizsgálatok .....	41
IV.3.1. Felhasznált egerek .....	41
IV.3.2. A BALB/c típusú egerek átmeneti neutropeniás állapotának kialakítása .....	41
IV.3.3. Oltóanyag készítés .....	41
IV.3.4. Fertőzés .....	42
IV.3.5. Antifungális terápia .....	42
IV.3.6. Szervtenyésztés .....	42
IV.3.7. Statisztikai adatelemzés .....	42
<b>V. Eredmények és értékelés .....</b>	<b>43</b>
V.1. Az <i>in vitro</i> érzékenységi vizsgálatok eredményei .....	43
V.1.1. A minimális gátló koncentráció értékei .....	43
V.1.2. Az idő-ölés kísérletek eredményei .....	46
V.1.2.1. Amphotericin B .....	46
V.1.2.2. 5-fluorocytoszín .....	49
V.1.2.3. Fluconazol .....	52
V.1.2.4. Voriconazol .....	55
V.1.2.5. Posaconazol .....	58
V.2. Az <i>in vivo</i> érzékenységi vizsgálatok eredményei .....	61

V.2.1. A <i>C. parapsilosis sensu stricto</i> izolátumokkal végzett vizsgálatok eredményei ..	61
V.2.2. A <i>C. orthopsilosis</i> izolátumokkal végzett vizsgálatok eredményei .....	63
V.2.3. A <i>C. metapsilosis</i> izolátumokkal végzett vizsgálatok eredményei .....	66
V.3. A kísérleti munkában részt vevő társszerzők munkájának ismertetése.....	70
<b>VI. Megbeszélés .....</b>	<b>71</b>
<b>VII. Összefoglalás .....</b>	<b>80</b>
<b>VIII. Summary .....</b>	<b>81</b>
<b>IX. Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>82</b>
<b>X. Irodalomjegyzék .....</b>	<b>83</b>
<b>XI. Tárgyszavak .....</b>	<b>119</b>
<b>XII. Függelék .....</b>	<b>122</b>

## Fontosabb rövidítések

AM3	antibiotikum medium 3 táptalaj
AMB	amphotericin B
ANI	anidulafungin
AUC	area under the curve = koncentráció görbe alatti terület
AUC/MIC	koncentráció görbe alatti terület/MIC
ATCC	American Type Culture Collection
BMD	broth microdilution method = leveshígítósos mikrodilúciós módszer
CAS	caspofungin
CBP	clinical breakpoint = klinikai határérték
CDR1, CDR2	<i>Candida</i> Drug Resistance genes in <i>C. glabrata</i> = <i>Candida</i> gyógyszer rezisztens gének a <i>C. glabrata</i> fajban
CFU	colony forming unit = kolóniaképző egység
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
C <sub>max</sub>	a szérum maximális gyógyszerkoncentrációja
C <sub>max</sub> /MIC	a szérum maximális gyógyszer koncentrációja/MIC
CpLIP1, CpLIP1	a <i>Candida parapsilosis</i> faj 1. és 2. lipáz génje
DÉ	dózisfüggően érzékeny
DMSO	dimetil-szulfoxid
ECV	Epidemiologic cutoff value = Epidemiológiai határérték
Elisa	Enzyme-linked immunosorbent assay = enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ERG3, ERG11	gene encoding sterol-C-5, 6-desaturase involved in ergosterol biosynthesis in <i>C. dubliniensis</i> = az ergosterol szintézisében résztvevő szterol-C-5,6-deszaturázt kódoló gének a <i>C. dubliniensis</i> fajban
É	érzékeny
FDA	Food and Drug Administration

FKS1, FKS2	a gombasejtfal szintéziséért felelős $\beta$ -1,3-D-glukán-szintetáz enzimkomplex két alegysége
FLU	fluconazol
5-FC	5- fluorocytosin
i.v.	intravénás
LFAmB	lipid-asszociált AMB
MDR1	multidrug transporter protein in <i>C. dubliniensis</i> = multidrug transzporter fehérje a <i>C. dubliniensis</i> fajban
MÉ	mérsékelten érzékeny
MIC	minimal inhibitor concentration = minimális gátló koncentráció
MIC <sub>24h</sub>	24 óra után leolvasott MIC érték
MIC <sub>48h</sub>	48 óra után leolvasott MIC érték
MIC <sub>50</sub> és MIC <sub>90</sub>	az a minimális gátló koncentráció, amely a fajok 50 illetve 90 %-át gátolja
MICA	micafungin
MFC	minimális fungicid koncentráció
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PAFE	post antifungal effect = posztantifungális hatás
POS	posaconazol
R	rezisztens
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute medium-sejttenyésztésre alkalmas táptalaj
VOR	voriconazol

# I. Bevezetés

Az antifungális szerek számának bővülése ellenére a *Candida* fertőzések eredményes kezelése továbbra is jelentős kihívást jelent. Ez az ellentmondás a fajok növekvő gyakoriságával, az epidemiológia átalakulásával, valamint a gyenge klinikai kimenetellel és a diagnózis nehéz felállításával magyarázható.

Az utóbbi évtizedekben a sarjadzó gombafajok által okozott invazív humán fertőzések gyakoribbá váltak [Nucci és mtsai. 2005, Pfaller és mtsai. 2007/a]. A leggyakoribb humán megbetegedést okozó *Candida* fajok közé a *C. albicans*, a *C. glabrata*, a *C. parapsilosis*, a *C. tropicalis* és a *C. krusei* tartoznak, amelyek mellett nem szabad megfeledkezni az olyan kisebb előfordulási gyakoriságú fajokról sem, mint a *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. norvegensis* és *C. dubliniensis* [Diekema és mtsai. 2009, Horn és mtsai. 2009, Pfaller és mtsai. 2010/a].

A modern molekuláris biológiai vizsgálatoknak köszönhetően a szigorú értelemben vett *C. parapsilosis* fajtól kevesebb, mint tíz évvel ezelőtt különítették el a *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* fajokat [Tavanti és mtsai. 2005]. Azóta egyre több vizsgálat hívta, illetve hívja fel a figyelmet a *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* sarjadzó gombafajok klinikai jelentőségére, amelyek a *Candida* fajok által okozott invazív fertőzések körülbelül 1 %-áért felelnek [Lattif és mtsai. 2009, Lockhart és mtsai. 2008, Tavanti és mtsai. 2005].

A *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* fenotípusosan azonosak, genotípusosan viszont eltérnek a *C. parapsilosis sensu stricto* fajtól [Lin és mtsai. 1995, Tavanti és mtsai. 2005].

*In vitro* vizsgálatok kimutatták, hogy a *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* antifungális szerekkel szembeni érzékenysége nem egyezik meg a *C. parapsilosis sensu stricto* érzékenységeivel. A *C. parapsilosis sensu stricto*-hoz képest a *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* viszonylag nagyobb fluconazol (FLU) minimális gátló koncentrációkkal (MIC) és kisebb amphotericin B (AMB) MIC értékekkel rendelkezik (MIC = az antifungális szer legkisebb koncentrációja, amely a vizsgált izolátum jól látható növekedésgátlását okozza a szert nem tartalmazó kontrollhoz képest) [Gomez-Lopez és mtsai. 2008, Lockhart és mtsai. 2008, van Asbeck és mtsai. 2008]. Ezenkívül mindhárom faj esetében csökkent echinocandin érzékenységet írtak le *in vitro*, mindemellett a *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* echinocandin MIC értékei kisebbek, azaz érzékenyebbek ezekkel a szerekkel szemben, mint a

*C. parapsilosis sensu stricto* [Cantón és mtsai. 2010, Garcia-Effron és mtsai. 2008, Gomez-Lopez és mtsai. 2008, Lockhart és mtsai. 2008, van Asbeck és mtsai. 2008].

A fertőzések sikeres klinikai kimenetelű kezelése csak az időben és megfelelően alkalmazott antifungális szerrel valósítható meg [Hope és mtsai. 2007, Pappas és mtsai. 2009, Pfaller és mtsai. 2012/a]. Mivel jelenleg csak a *C. parapsilosis sensu stricto* okozta fertőzésekre létezik érvényes antifungális kezelési irányelv, így a két újonnan elkülönített faj esetében valószínűsíthető egy új kezelési stratégia felállításának szükségessége [Pappas és mtsai. 2009].

Az általunk végzett vizsgálatok fontosságát alátámasztja, hogy a *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* antifungális szerekkel szembeni érzékenységről nem sok információ található a szakirodalomban. Továbbá elengedhetetlennek tartjuk a kevésbé gyakori *Candida* fajok echinocandin érzékenységről való adatgyűjtést, mivel ezeket az empirikus terápiaként javasolt szereket, köztük a caspofungint (CAS) egyre gyakrabban alkalmazzák *Candida* fajok okozta invazív fertőzések kezelésében [Carrillo-Muñoz és mtsai. 2008, Swoboda és mtsai. 2009].

Ezen túlmenően az *in vitro* vizsgálatokból nyert megfigyelések *in vivo* igazolása nélkülözhetetlen. Bár az *in vitro* eredmények leírnak egy bizonyos mértékű antifungális szer aktivitást, de a fertőzés helyén kialakuló tényleges hatás az élő szervezet és a gyógyszer között kialakuló kölcsönhatások miatt ettől eltérhet.

Ezeket a gondolatokat szem előtt tartva munkánk során öt antifungális szer (AMB, FLU, voriconazol (VOR), CAS, 5-fluorocytosin (5-FC)) *in vitro* aktivitását hasonlítottuk össze a *Candida parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* fajok ellen, majd az öt szerből hármat kiválasztva (AMB, FLU, CAS) *in vivo* is elvégeztük ezt az összehasonlítást. Végezetül arra kerestük a választ, hogy a *C. parapsilosis sensu stricto* faj által okozott fertőzésekre jelenleg érvényes kezelési irányelvek alkalmazhatóak-e a *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* fertőzések esetén is.

## II. Irodalmi áttekintés

### II.1. A *Candida* fajok által okozott megbetegedések általános jellemzése

A *Candida* fajok az ép gastrointestinalis rendszer és genitális tájék nyálkahártyáinak kommenzalistái [Arendrup és mtsai. 2010]. Legyengült gazdaszervezeti immunitás, neutropeniás állapot és sérült nyálkahártyák esetén patogénné válhatnak, amelynek következtében lokális felszíni (pl.: oropharingealis és esophagealis candidiasis), valamint mélyen fekvő szisztémás betegségek (pl.: peritonitis, candidaemia, endocarditis, meningitis) kialakítására képesek [Arendrup és mtsai. 2010, Blumberg és mtsai. 2001, Diekema és mtsai. 2004, Fridkin és mtsai. 2005, Lass Flölr és mtsai. 2009, Miceli és mtsai. 2011, Ostrosky-Zeichner és mtsai. 2002]. A fertőzések legnagyobb hányada endogén eredetű, ugyanakkor exogén forrásból is származhatnak [Binder és mtsai. 2011, Pfaller és mtsai. 2007/a, Singh és mtsai. 2001].

A *Candida* fajok által okozott véráramfertőzés, azaz candidaemia az invazív candidiasis egyik leggyakoribb manifesztációja, mivel a fertőzöttek körülbelül 50-70 %-ánál alakul ki, és a betegpopulációtól függően candidaemiában, többszervi elégtelenségben nyilvánulhat meg, illetve halálos kimenetelű is lehet [Ghannoum MA és mtsai. 2010, Kappstein és mtsai. 1998, Sims és mtsai. 2005].

A disszeminált candidiasis rendszerint rosszindulatú hematológiai elváltozások miatt, citotoxikus kemoterápia által kiváltott neutropénia következtében alakul ki [Kontoyiannis és mtsai. 2000]. Az invazív candidiasis másik, szintén inkább neutropeniások esetén megfigyelhető klinikai manifesztációja a különálló erythemás és haemorrhagiás kiütések [Anassie és mtsai. 1998, Bodey és mtsai. 1974, Fine és mtsai. 1981]. A kezeletlen candidaemia és a fertőzés hematogén terjedésének első jelei a chorioretinitis és az endophthalmitis lehetnek, nem megfelelő terápia esetén vakság is kialakulhat [Pappas és mtsai. 2009]. Az endocarditis, pericarditis és szeptikus thrombophlebitis rendszerint központi vénás katéter alkalmazásakor fejlődik ki [Alam és mtsai. 2007].

A kóros állapot klinikai tünetei lehetnek az antibiotikumokra nem reagáló láz, hasi fájdalom és hepatosplenomegalia [Ghannoum és mtsai. 2010, Kontoyiannis és mtsai. 2000]. Nemrégiben megfigyelték, hogy a disszemináció 53 %-ban a hasüreget, 9,5 %-ban a tüdőt, 7,8 %-ban a lágy szöveteket, bőrt, 5 %-ban a szemet, 3,9 %-ban a szívet, 1,7 %-ban a

csontrendszert és 1,1 %-ban a központi idegrendszert érinti [Horn és mtsai. 2009]. A vér vizsgálata negatív tenyésztési eredményt és megemelkedett szérum alkalikus foszfát koncentrációt mutathat [Ghannoum és mtsai. 2010]. Leképzéses vizsgálatokkal a májban, lépben, vesékben és ritkán a tüdőben többgócós léziók mutathatóak ki [Ghannoum és mtsai. 2010]. Abban az esetben, ha a fertőzés a csontrendszert érinti leggyakrabban hátfájdalommal járó osteomyelitis illetve discitis, míg a központi idegrendszerre való kiterjedés esetén meningitis és agyi tályogok alakulhatnak ki [Rimek és mtsai. 2004].

Felmérések alapján az invazív candidiasis leginkább a rendkívül alacsony születési súlyú újszülötteket, koraszülötteket, súlyos alapbetegségben szenvedőket, valamint az intenzív osztályon hosszabb ideig ápolt betegeket, a komplikált vagy ismételt hasüregi műtötteket, a rosszindulatú daganatban vagy akut pancreatitisben szenvedőket, továbbá a szervátültetetteket és az égési sérülteket érinti [Almirante és mtsai. 2005, Arendrup és mtsai. 2010, Mahieu és mtsai. 2010, Playford és mtsai. 2010/a, Segal és mtsai. 2006]. Ezen túlmenően az invazív candidiasis kialakulására még számos olyan gazdaszervezeti tényező hajlamosít, mint a széles spektrumú antibiotikumos terápia, a többgócós *Candida* kolonizáció, diabetes, központi vénás katéter, parenterális táplálás, dialízis vagy szteroidok szedése [Arendrup és mtsai. 2010, Blumberg és mtsai. 2001, Ostrosky-Zeichner és mtsai. 2007, Pfaller és mtsai. 2007/a].

Az invazív candidiasis kialakulása valószínűsíthető, ha a beteget 48 óránál hosszabb ideig intenzív osztályon ápolják, antibiotikum terápiát kap vagy a kezelés első négy napjában központi vénás katétere van [Kontoyiannis és mtsai. 2001, Lin és mtsai. 2005, Ostrosky-Zeichner és mtsai. 2007].

A *Candida* fajok virulenciájának egyik fő oka a különböző környezethez való rugalmas alkalmazkodási képességük és biofilm képző tulajdonságuk, amely megnöveli a felületekhez való tapadásukat, ezáltal pedig a fertőzések kialakulásának esélyét [Ramage és mtsai. 2005].

A fertőzés kimenetele függ az alkalmazott antifungális szertől, azok dózisától, a terápia időzítésétől, a fertőzés elsődleges kezelésétől, a gazdaszervezet állapotától és természetesen az előidéző kórokozótól is [Arendrup és mtsai. 2010].

## **II.2. A *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* és *Candida krusei* fajok epidemiológiája**

Mivel az antifungális érzékenységi mintázat szorosan kapcsolódik a fajhoz, a lokális és regionális epidemiológiai felmérések alapvető fontosságúak az empirikus terápiás stratégiák felállítására és az antifungális rezisztencia változásának nyomonkövetése szempontjából.

A *Candida* fajok epidemiológiája jelentős regionális, valamint időbeli változásokkal jellemezhető. Az élesztőgombák által okozott fertőzések legfőbb kórokozója a *C. albicans*, de a nem-*albicans* *Candida* fajok gyakorisága sem elhanyagolható, sőt előfordulási arányuk újabban nagyobb (50 % feletti), mint a *C. albicans* fajé (45,6 %) [Bassetti és mtsai. 2006, Horn és mtsai. 2009, Pereira és mtsai. 2010].

A *Candida* fertőzések növekvő számát figyelték meg az 1980-as években, majd változó gyakorisági arányokat dokumentáltak, de a legtöbb vizsgálat szerint összességében nőtt az invazív candidiasis eseteinek száma [Arendrup és mtsai. 2010, Bassetti és mtsai. 2009, Laupland és mtsai. 2005, Pfaller és mtsai. 2007/a, Playford és mtsai. 2010/a-b, Sandven és mtsai. 2006].

Az eltérő megfigyelések oka nem teljesen világos; egyrészt a nem egyformán végzett tanulmányokkal magyarázható, másrészt a fajok eloszlásában statisztikailag szignifikáns eltérések lehetnek a tenyésztési módszerek, alapteregség, életkor, nem, előzetes antifungális terápia, rosszindulatú hematológiai elváltozások, neutropéniás állapot és a kísérő bakteriális fertőzés alapján [Arendrup és mtsai. 2010, Horn és mtsai. 2007, Pfaller és mtsai. 2007/a].

Az orvostudomány fejlődésével bár jelentősen javult a kritikus állapotú, intenzív osztályokon ápolott betegek túlélési aránya, esetükben viszont rendszeresen a fertőzéses komplikációk [Horn és mtsai. 2009, Mikulska és mtsai. 2011, Nucci és mtsai. 2005, Pfaller és mtsai. 2004/a]. Az invazív candidiasis arányának emelkedése talán ezzel magyarázható a leginkább.

Annak ellenére, hogy több mint 17 különböző *Candida* faj okozhat invazív candidiasis-t, az intenzív és nem intenzív osztályokon kialakuló fertőzések több mint 90 %-át mindössze öt *Candida* faj: a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* és a *C. krusei* idézi elő [Bassetti és mtsai. 2006, Leroy és mtsai. 2009, Ruan és mtsai. 2008]. A különböző osztályok izolátum gyakorisága kismértékben eltér; az intenzív osztályokon ápoltak esetében a *C.*

*albicans* és *C. tropicalis*, a többi betegnél a *C. glabrata* és *C. parapsilosis* a leggyakrabban kitenyésztett *Candida* faj [Hazen és mtsai. 1995, Pfaller és mtsai. 2004/e].

A legnagyobb gyakoriság általában szélsőséges életkorokban figyelhető meg, ugyanis az egy évnél fiatalabbak esetében tízszer, míg a 65 évnél idősebbek körében ötször gyakoribb a candidaemia [Almirante és mtsai. 2005, Arendrup és mtsai. 2008, Chen és mtsai. 2006, Hajjeh és mtsai. 2004, Pfaller és mtsai. 2007/a]. A fajeloszlás korcsoportonkénti eltérését egy újabb megfigyelés is igazolja, amely szerint a *C. albicans* a 60-79 évesek között a leggyakoribb (52,3 %), míg a 80-99 évesek között a legritkább (46,7 %) [Pfaller és mtsai. 2010/a]. A *C. glabrata* szintén az idősebb, 80-99 évesek között gyakoribb (28,6 %), viszont a fiatalabb, 0-19 évesek között ritkább előfordulású (2 %) [Pfaller és mtsai. 2010/a]. A *C. parapsilosis sensu stricto* (28,5 %) és *C. tropicalis* (12,9 %) a 0-19 év közöttiek, a *C. krusei* (3,5 %) pedig a 20-39 évesek esetén bizonyult a leggyakoribb *Candida* fajnak [Pfaller és mtsai. 2010/a].

A frankfurti Johann Wolfgang Goethe egyetemen kimutatták, hogy az invazív gombafertőzések előfordulási gyakorisága a rosszindulatú hematológiai elváltozásokban szenvedők esetén volt a legnagyobb (33 %), amelyet a transzplantáltak (22,9 %), a HIV-fertőzöttek (19,7 %), a daganatos (4,8 %) és végül az egyéb betegségekben szenvedők (3,5 %) követték [Lehrnbecher és mtsai. 2010].

Becslések szerint a *Candida* fajok az Egyesült Államok kórházaiban a negyedik, míg Európában a tizedik leggyakrabban izolált mikroorganizmusok [Bouza és mtsai. 2008, Pfaller és mtsai. 2007/a, Wisplinghoff és mtsai. 2004]. Pfaller és munkatársainak [2011/e] felmérése alapján a *Candida* véráramfertőzések előfordulása Latin-Amerikában nagyobb (56,5 %), mint Európában (44,4 %) és Észak-Amerikában (39,6 %), habár az utóbbi két évben az intenzív osztályokon kialakuló candidaemia aránya mind Latin- és Észak-Amerikában csökkent.

A *C. albicans* előfordulási gyakoriságában Pfaller és munkatársai [2007/a] szintén csökkenést figyeltek meg, legritkábban Latin-Amerikában (37 %), legnagyobb arányban pedig, Norvégiában (70 %) tenyésztették ki.

A *C. glabrata* az Egyesült Államokban vitathatatlanul jelentős oportunistá korokozóvá vált, hiszen a véráramfertőzések 20-24 %-áért felelős, ezáltal a második leggyakoribb *Candida* faj [Fidel és mtsai. 1999, Gumbo és mtsai. 1999, Malani és mtsai. 2005, Pfaller és mtsai. 2003/b, Pfaller és mtsai. 2007/a, Redding és mtsai. 2003]. Ezzel szemben más országokban kevésbé gyakori; Franciaországban, Olaszországban, Norvégiában, Svájcban, Finnországban, Izlandon

és Tajvanban a megnövekedett FLU alkalmazás ellenére sem vált számuk gyakoribbá [Asmundsdottir és mtsai. 2002, Chen és mtsai. 2003, Cheng és mtsai. 2004, Hseuh és mtsai. 2005, Levin és mtsai. 1998, Marchetti és mtsai. 2004, Poikonen és mtsai. 2003, Richet és mtsai. 2002]. Ez a faj a véráramfertőzések kórokozójaként Latin-Amerikában csak 4-7 %-os arányban fordul elő [Pfaller és mtsai. 2007/a]. Különböző vizsgálatok szerint Európában (10,5 % → 8,8 %) és a csendes-óceáni térségben (12,1 % → 7,2 %) is csökkenő előfordulását figyelték meg 2002 és 2004 között, bár a vérmintákból való izolálási gyakoriságuk eltérő [Pfaller és mtsai. 2006/a]. A *C. glabrata* véráramfertőzés egyik leggyakoribb rizikófaktora a FLU terápia [Horn és mtsai. 2009, Lin és mtsai. 2005, Malani és mtsai. 2005].

Az Egyesült Államokban a FLU profilaxis csökkentette a *C. tropicalis* okozta candidaemia eseteinek számát, azonban a csökkenő tendencia ellenére a faj által okozott halálozás még mindig jelentős [Abi-Said és mtsai. 1997, Kontoyiannis és mtsai. 2001]. Amíg a *C. tropicalis* csak a negyedik leggyakoribb Észak-Amerikában (a candidaemiás esetek 7 %-a), addig a második leggyakoribb Latin-Amerikában (20 %), és még a *C. glabrata* fajnál is gyakoribb Ázsiában (14-21 %) [Pfaller és mtsai. 2004/e, Pfaller és mtsai. 2005/a].

A *C. krusei* az összes candidaemia 2-4 %-áért felel, azonban ennél nagyobb gyakorisággal is előfordul európai és észak-amerikai daganatos betegeknél [Abi-Said és mtsai. 1997, Marr és mtsai. 2000, Viscoli és mtsai. 1999, Wingard és mtsai. 1991]. Horn és munkatársai [2009] a legnagyobb mértékű mortalitási arányt (52,9 %) a *C. krusei* okozta candidaemia esetén figyelték meg. Annak ellenére, hogy a *C. krusei* fertőzések száma a FLU profilaxisban részesülő vér- és csontvelő transzplantáltak esetében egyértelműen nőtt, ez a szer önmagában nem növelte a faj gyakoriságát, mivel ezt a tendenciát egyes intézeteknél már az azol típusú antifungális szer bevezetése előtt is megfigyelték [Abi-Said és mtsai. 1997, Iwen és mtsai. 1995, Lin és mtsai. 2005]. Lin és munkatársai [2005] szerint a piperacillin-tazobactam és vancomycin antibiotikumok sokkal nagyobb mértékben hajlamosítanak a *C. krusei* fertőzés kialakulására, mint a FLU antifungális terápia. Szerintük ezek a szerek, a normál flóra megváltoztatásával csökkentik a gazdaszervezet gomba kolonizációval szembeni ellenállását és így elősegítik a kórokozó megtapadását a bőrön, valamint a gyomor-bél rendszerben [Lin és mtsai. 2005].

### **II.3. A *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* és *Candida metapsilosis* jellemzése**

A *C. parapsilosis* fajt 1928-ban, először maltóz fermentációra képtelen *Monilia* fajként hasmenéses betegek székletéből Ashford [1928] azonosította; amelyet *Monilia parapsilosis*-nak nevezett el, a régen *Monilia psilosis*-ként, ma viszont *C. albicans* néven ismert gyakoribb gombafajtól való elkülönítés céljából [Weems és mtsai. 1992].

Ezt a *C. parapsilosis sensu lato* néven ismert fajt 2005 előtt háromtagú bicsoportba (I-III) sorolták, később a tagok közötti elegendő különbséget kimutató genetikai vizsgálatoknak köszönhetően a következő, egymással közeli rokonságban álló fajokként osztályozták őket: *Candida parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* [Tavanti és mtsai. 2005].

A „*psilosis*” csoportba tartozó fajok sejtjei nagyon hasonlóak; ovális, kör vagy hengeres alakúak, amelyek Sabouraud táptalajon fehér színű, krémes, fénylő, illetve sima vagy ráncos felszínű telepeket képeznek [Trofa és mtsai. 2008]. Valódi hifát nem alakítanak ki, élesztő (sima vagy kráteres telep) vagy pseudohifa (gyűrött vagy koncentrikus telep) formában fordulnak elő [Laffey és mtsai. 2005, Trofa és mtsai. 2008].

A *C. parapsilosis sensu lato* széleskörűen elterjedt, az egészséges emberi szervezet normális mikrobiális flórájának kommenzalista tagja, patogenitásának az ép bőr szab határt [Trofa és mtsai. 2008]. Leggyakrabban köröm alól izolálják, de a *C. albicans* és *C. tropicalis* fajoktól eltérően nem kizárólagos humán patogén, mivel háziállatokból, rovarokból, talajból és tengeri környezetből is kitenyészthető [Fell és mtsai. 1967, Weems és mtsai. 1992].

A *C. parapsilosis sensu lato* kolonizáció és a fertőzés kialakulása a faj gazdaszervezeti sejtekhez, szövetekhez, különösen nyálkahártya felszínekhez való tapadási képességétől függ [Trofa és mtsai. 2008].

A *C. albicans* és a *C. parapsilosis sensu lato* fajokat összehasonlítva azt tapasztalták, hogy ez utóbbi az orális nyálkahártyához 20,6 %-kal, akril anyagokhoz pedig, 243,7 %-kal kötődött nagyobb mértékben [Panagoda és mtsai. 2001].

A „*psilosis*” csoport tagjai biofilmet képesek képezni, amely extracelluláris mátrixon belüli mikroorganizmusok felszínnel összefüggő csoportosulásai [Kuhn és mtsai. 2002/b]. Egyes

vizsgálatokban viszont a *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* nem képzett biofilmet [de Toro és mtsai. 2011, Song és mtsai. 2005, Tavanti és mtsai. 2007]. A *C. albicans* biofilm képzése az élesztőről hifa formára való dimorfikus áttéréssel áll összefüggésben; a kialakuló biofilm egy vékonyabb alap, élesztő sejtes és egy vastagabb, kevésbé tömör hifás rétegből áll [Baillie és mtsai. 1999]. Ezzel szemben a „*psilosis*” csoport tagjai kisebb mennyiségű és kevésbé összetett szerkezetű biofilmet képeznek [Hawser és mtsai. 1994, Kuhn és mtsai. 2002/a]. Némely, pszeudohifa fenotípusú *C. parapsilosis sensu lato* törzs több, és a táptalajba jobban behatoló biofilmet alakít ki, mint a túlnyomóan élesztő alakban létezők [Laffey és mtsai. 2005].

A fajok különféle orvosi eszközökön, mint például központi és perifériás vénás katétereken, hemodialízisben és peritoneális dialízisban használt katétereken, intrakardiális szerkezeteken, és művegtagokon képesek megtapadni [Ramage és mtsai. 2006].

A biofilm számos *Candida* faj hatékony virulencia faktora, ugyanis védelmezi a gombasejteket a gazdaszervezeti immunválasszal szemben, valamint korlátozza a hagyományos antifungális szerek (poliének, azolok) mátrixon keresztül történő penetrációját; ugyanakkor az echinocandinok és a LFAMB készítmények gátolhatják képződésüket [Katragkou és mtsai. 2007, Ruzicka és mtsai. 2007]. A biofilm képző izolátumok által okozott fertőzések mortalitási aránya jelentősen nagyobb (70 % körüli) a biofilmet nem képzőkhöz képest (30 % körüli) [Trofa és mtsai. 2008, Tumbarello és mtsai. 2007].

A *C. parapsilosis sensu lato* jellemzője, hogy aszpartil proteinázok, foszfolipázok, lipázok karbonil- és xilóz reduktázok kiválasztására képesek [Brunel és mtsai. 2004, Hrusková-Heidingsfeldová és mtsai. 2009, Kataoka és mtsai. 2004, Lee és mtsai. 2003].

A proteinázok a gazdaszervezeti szövetek invázióját és kolonizációját segítik elő, a nyálkahártya membránok károsítása, és olyan fontos proteinek degradálása által, mint az immunoglobulin G nehéz láncok,  $\alpha_2$ -makroglobulin, C3 fehérje,  $\beta$ -laktoglobulin, laktoperoxidáz, kollagén és fibronektin [Pichova és mtsai. 2001, Ruchel és mtsai. 1992]. A *C. albicans* fajjal ellentétben a *C. parapsilosis sensu lato* esetében csak három szekretált aszpartil proteinázt azonosítottak, amelyek aktivitása a *C. albicans*-hoz képest kisebb mértékű és termelésük izolátumonként eltérő [Merkerova és mtsai. 2006, Odds és mtsai. 1987, Ruchel és mtsai. 1986]. Egy vizsgálat során a *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumok 80 %-a, a *C. orthopsilosis* törzsek 25 %-a magas proteináz aktivitását mutatott, míg a *C. metapsilosis*

izolátumoknak nem volt proteínáz aktivitása [Lin és mtsai. 1995, Sabino és mtsai. 2011, Scherer és mtsai. 1987].

A foszfolipázok képesek a glicerofoszfolipidek észter kötéseit hidrolizálni és feltételezik, hogy részt vesznek a gazdaszervezet sejtjeinek membránkárosításában [Ghannoum és mtsai. 2000, Kantarcioglu és mtsai. 2002]. Ezek az enzimek a *C. albicans* esetén befolyásolják az epiteliális sejtekhez való adhéziót, a gazdaszervezeti sejtekbe való penetrációt és a rekonstruált humán orális epitélium invázióját; a „*psilosis*” csoport esetén azonban a patogenitásban való szerepük kevésbé tisztázott [Dagdeviren és mtsai. 2005, Fernando és mtsai. 1999, Jayatilake és mtsai. 2005, Schaller és mtsai. 2005]. Az eddigi megfigyelések ellentmondásosak, mivel egyesek nem, addig mások a *C. parapsilosis sensu lato* izolátumok 51 %-ánál figyeltek meg foszfolipáz aktivitást [Ghannoum és mtsai. 2000, Kantarcioglu és mtsai. 2002, Shimizu és mtsai. 1996].

A lipázok a triacilglicerolok hidrolízisét és szintézisét katalizálják, feltételezett szerepei közé sorolhatók a lipidek emésztése, a gazdaszervezeti sejtekhez és szövetekhez való adhézió, más enzimekkel való szinergista kölcsönhatások, a járulékos foszfolipolitikus aktivitás miatti nem specifikus hidrolízis és gyulladási folyamatok beindítása az immunsejtek befolyásolása által [Trofa és mtsai. 2008]. A *C. albicans* esetében tíz, a *C. parapsilosis sensu lato* esetében két lipáz gént (CpLIP1, CpLIP2) azonosítottak [Hube és mtsai. 2000].

Rekonstruált, humán többrétegű epidermális- és orális epithel szöveteket *C. parapsilosis sensu stricto* és *C. orthopsilosis* izolátumokkal fertőzve a basalis sejtek deformálódtak, a celluláris hidak fokozatosan eltűntek és fokozódott az intracelluláris ödéma, majd a sejtek apoptózisa és nekrozisa következett be [Gácsér és mtsai. 2007].

A *C. orthopsilosis* a *C. parapsilosis sensu stricto*-hoz hasonló, míg a *C. metapsilosis* kisebb mértékű virulenciával jellemezhető, ugyanis a „*psilosis*” csoportban ez a legérzékenyebb a gazdaszervezeti válaszreakciókkal szemben [Gácsér és mtsai. 2007, Orsi és mtsai. 2010, Trofa és mtsai. 2008]. A három faj közül genetikailag a *C. metapsilosis* a legheterogénebb [Orsi és mtsai. 2010].

A *C. orthopsilosis* főleg nem neutropéniás betegek különböző testtájairól (vér, köröm, bőr, tüdő, vizelet és katéter) izolálható, a *C. metapsilosis* fajok ritkábban, de szintén kitenyészthetők humán mintákból [de Toro és mtsai. 2011]. Mindkét faj az invazív *Candida* fertőzések körülbelül 1 %-áért felel [Lockhart és mtsai. 2008, Tavanti és mtsai. 2005].

Sabino és munkatársai [2011] megállapították, hogy a környezetből izolált *C. parapsilosis* törzsek a vérből kitenyésztett, klinikai izolátumokhoz képest ellenállóbbak a gazdaszervezet fagocita sejtjeivel szemben és szignifikánsan nagyobb sejtkárosítást eredményeznek. Ezzel ellentmondásos az a megfigyelés, hogy a klinikai izolátumok szignifikánsan nagyobb mértékű TNF- $\alpha$  termelést okoznak, mint a környezeti izolátumok [Sabino és mtsai. 2011]. Míg a *C. parapsilosis sensu stricto* és a *C. orthopsilosis* fajjal szemben termelt TNF- $\alpha$  mennyisége megegyezett, addig a *C. metapsilosis* esetében ez kisebb volt [Sabino és mtsai. 2011].

A nozokomiális gombafertőzések transzmissziós útjai és behatolási kapui a kórokozó fajtól függően különbözőek lehetnek [Muñoz és mtsai. 2001, Sautour és mtsai. 2009].

A *C. albicans* és *C. tropicalis* okozta invazív betegségek általában endogén eredetűek, a fertőzéseket korábbi kolonizáció előzi meg, valamint jellegzetességük a vertikális, tipikusan anyáról csecsemőre történő átvitel [Trofa és mtsai. 2008]. Ezzel szemben a *C. parapsilosis sensu lato* által okozott invazív fertőzések inkább exogén eredetűek, előzetes kolonizáció nélkül is megjelenhetnek és gyakran horizontálisan adódnak át, olyan fertőzött külső forrásokból, mint a különböző orvosi eszközök, folyadékok, a kórházi ápolók kézfeje, katéterek és művégtagok [Clark és mtsai. 2004, Gácsér és mtsai. 2007, Hernández-Castro és mtsai. 2010, Latiff és mtsai. 2009, Lupetti és mtsai. 2002, Muñoz és mtsai. 2001, Sautour és mtsai. 2009, Tavanti és mtsai. 2005, van Asbeck és mtsai. 2007].

A *C. parapsilosis sensu lato* fajok által okozott fertőzések kialakulásában olyan, a többi *Candida* fajra inkább jellemző források is szerepet játszhatnak, mint például az endogén csecsemő illetve az anyai flóra [Levin és mtsai 1998, Lupetti és mtsai 2002, Vaz és mtsai 2011].

A *C. parapsilosis sensu lato* kórházi járványok számos, különösen az újszülött intenzív osztályokat érintő eseteiről már többen is beszámoltak [Clark és mtsai. 2004, Huang és mtsai. 1999, Neofytos és mtsai. 2006, Saxen és mtsai. 1995, Sheretc és mtsai. 1992, van Asbeck és mtsai. 2007, van Asbeck és mtsai. 2009, Vaz és mtsai. 2011]. Ezen járványok leggyakoribb forrása a kórházi ápolók kézfeje volt. Vaz és munkatársai [2011] egy tajvani gyerekkórház újszülött intenzív osztályának *C. parapsilosis* járványa után kimutatták, hogy a véráramfertőzést okozó izolátumok mindegyike az ápolók kézfejéről származott.

A koraszülöttek gyakoribb *C. parapsilosis* fertőzése azzal magyarázható, hogy bőrük és nyálkahártya membránjuk exogén kórokozókkal szemben nagyobb permeabilitású, mint az

idősebbeké, ezért ezeket az alacsony születési súlyú csecsemőket életük első hetében, nagyobb mértékben veszélyezteteti szisztémás candidiasis kialakulása [van Asbeck és mtsai. 2007].

A többi *Candida* fajjal összehasonlítva a *C. parapsilosis* által okozott fertőzések mortalitási aránya alacsonyabb [Horn és mtsai. 2009, Pfaller és mtsai. 2007/a]. Rosszindulatú hematológiai betegségben szenvedők esetén a faj által okozott teljes mortalitás 34 %, de az alapbetegségek miatt ez az arány tulajdonképpen csak 9 % volt [Girmenia és mtsai. 1996].

A faj exogén eredete miatt a véráramfertőzés megfelelően betartott infekciókontrollal, helyes kézmosással, katéter elhelyezéssel és felügyelettel megelőzhető [Levin és mtsai. 1998].

A véráramfertőzések nagy részéért a nem-*Candida albicans* fajok a felelősek, melyek közül a *C. parapsilosis* Ázsiában, Latin-Amerikában és egyes európai országokban a második leggyakoribb [Almirante és mtsai. 2006, Costa-de-Oliveira és mtsai. 2008, Pemán és mtsai. 2005, Pfaller és mtsai. 2005/a-b]. Gyerekek esetén is ez a második leggyakrabban candidaemiát okozó, sőt egyes gyermekkorházakban az első helyen áll [Arendrup és mtsai. 2011, Blyth és mtsai. 2009, Lin és mtsai. 1995, Neu és mtsai. 2009, Zaoutis és mtsai. 2005].

A *Candida* fajok közül 1990 óta a *C. parapsilosis* előfordulása nőtt a legnagyobb mértékben, annak ellenére, hogy a *C. albicans* fajnál kisebb virulenciájú [Trofa és mtsai. 2008].

Észak-Amerikában a *Candida* fertőzések 8-15,5 %-a, Európában 20-30 %-a, Latin-Amerikában 23,4 %-a volt *C. parapsilosis* [Almirante és mtsai. 2006, Bassetti és mtsai. 2006, Bedini és mtsai. 2006, Gácsér és mtsai. 2007, Goncalves és mtsai. 2010, Lockhart és mtsai. 2008, Messer és mtsai. 2006, Pfaller és mtsai. 2008/b, Pfaller és mtsai. 2008/d, Rodero és mtsai. 2005, Tavanti és mtsai. 2005, Tavanti és mtsai. 2007]. Ezzel ellentétben 1997 és 2005 között Ázsiában, Latin- és Észak-Amerikában, Európában, Afrikában, valamint a Közép-Keleten a *C. parapsilosis* csak a negyedik helyet foglalta el (6,1 %) a *C. albicans* (65,6 %), a *C. glabrata* (11,1 %) és a *C. tropicalis* (6,9 %) után [Pfaller és mtsai. 2007/b]. A *C. parapsilosis* előfordulási arányának gyors emelkedését bizonyítja, hogy az 1997-2000 közötti 4,8 %-ról 2001 és 2005 között 6,6 %-ra nőtt [Trofa és mtsai. 2008]. Magyarországon eddig 6 és 9 %-os előfordulással izolálták [van Asbeck és mtsai. 2008].

A *C. parapsilosis sensu stricto* fertőzés minden korcsoportban előfordul, újszülöttek esetében 30 %, míg a felnőttek körében 10-15 % az előfordulási gyakoriságuk [Cantón és mtsai. 2011,

Pappas és mtsai. 2003, Saiman és mtsai. 2000, Saiman és mtsai. 2001, Wisplinghoff és mtsai. 2004]. A kritikus állapotú újszülöttek *C. parapsilosis sensu lato* fertőzése különösen gondot jelent; az Egyesült Királyságban az alacsony születési súllyú újszülöttek invazív gombás fertőzésének több mint negyedét, Észak-Amerikában a *Candida* véráramfertőzések harmadát okozzák, továbbá számos újszülött intenzív osztályon ez a neonatális mortalitásért felelőssé tehető uralkodó kórokozó faj [Clerihew és mtsai. 2007, Fridkin és mtsai. 2006].

A *C. parapsilosis sensu lato* csoporton belül egyértelmű a *C. parapsilosis sensu stricto* legnagyobb gyakorisága (87-94 %), amit a *C. orthopsilosis* (0-9 %), majd a *C. metapsilosis* (1,5-8,4 %) követ [Cantón és mtsai. 2011]. Az elmúlt években sokat vizsgált fajeloszlás kontinensenként, országonként eltérő, az epidemiológiai leírások csak részleges demográfiai információt adnak (pl.: kórházi osztály, alapbetegség alapján), összehasonlításuk nem egyszerű [Borghi és mtsai. 2011, Chen és mtsai. 2010, Gomez-Lopez és mtsai. 2008, Lockhart és mtsai. 2008, Mirhendi és mtsai. 2010, Silva és mtsai. 2009, Tavanti és mtsai. 2007, Tay és mtsai. 2009]. Egyesek például a *C. metapsilosis* fajt a *C. orthopsilosis*-nál nagyobb előfordulással írták le [Chen és mtsai. 2010, Gomez-Lopez és mtsai. 2008, Pryce és mtsai. 2006, Silva és mtsai. 2009].

Miután a korábban *C. parapsilosis* II és III néven ismert *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* fajokat molekuláris biológiai módszerekkel elkülönítették kiderült, hogy a régebbi *C. parapsilosis* fertőzések kevesebb, mint 10 %-át a két újabban elkülönített faj okozza [Gomez-Lopez és mtsai. 2008, Lockhart és mtsai. 2008, Trofa és mtsai. 2008, van Asbeck és mtsai. 2009]. Az összes *C. parapsilosis sensu lato* fertőzésben a *C. orthopsilosis* Venezuelában (16,5 %), Braziliában (16 %), Ázsiában (11 %) és Olaszországban (8 %) fordult elő a legnagyobb arányban [Lockhart és mtsai. 2008, Tavanti és mtsai. 2005]. A *C. orthopsilosis* így, 1-2 %-ban izolálható candidemiás betegekből [Lockhart és mtsai. 2008].

A *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* fajok a dél-amerikai országokban figyelhetők meg a leginkább [Lockhart és mtsai. 2008]. A *C. metapsilosis* Spanyolországban az ötödik, a *C. orthopsilosis* pedig a hatodik leggyakrabban előforduló fertőzést okozó faj [Gomez-Lopez és mtsai. 2008]. Spanyolországban a *C. metapsilosis*-t 1,7 %-os előfordulással detektálták, a *C. orthopsilosis* fajt pedig 1,4-23,8 % közötti prevalenciával írták le Dél-Amerikában és Malajziában is [Cantón és mtsai. 2011, Gomez-Lopez és mtsai. 2008, Lockhart és mtsai. 2008, Tavanti és mtsai. 2007]. A két faj kisebb gyakorisága a *C. parapsilosis sensu stricto*-hoz viszonyított gyengébb virulenciáját jelzi [Orsi és mtsai. 2010]. Ennek ellenére egy texasi

és braziliai kórházban már alakult ki *C. orthopsilosis* járvány [Lin és mtsai. 1995, Zancoppe-Oliveira és mtsai. 2000].

A *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* előfordulási gyakoriságában is korcsoportonkénti különbségek figyelhetőek meg [Cantón és mtsai. 2011]. A *C. metapsilosis* fajt eddig kizárólag csak felnőttek esetén tenyésztették ki, a *C. orthopsilosis* is gyakoribb az idősebbek körében [Cantón és mtsai. 2011, Diekema és mtsai. 2009, Garcia- Efron és mtsai. 2011, Gomez-Lopez és mtsai. 2008, Goncalves és mtsai. 2010, Lockhart és mtsai. 2008]. Ezzel szemben Tay és munkatársai [2009] felnőttek vérmintáiból nem izolált *C. metapsilosis* fajt.

## II.4. Antifungális terápia

A jelenleg elérhető antifungális szerek hét osztályából négy alkalmas szisztémás infekciók kezelésére: a poliének, az azolok, az echinocandinok és a nukleozid analógokhoz sorolt 5-fluorocytosin (1. táblázat) [Chapman és mtsai. 2008, Pappas és mtsai. 2009].

1. táblázat. Az antifungális szerek csoportjai [Chapman és mtsai. 2008].

Antifungális szerek csoportjai	Hatásmechanizmus	Elsődleges alkalmazás
<b>Poliének</b>	Az ergoszterolhoz kötődve megbontják a gombasejt membránját.	Szisztémás és opportunisták mikózisok kezelése.
Amphotericin B Lipid asszociált amphotericin B Nystatin		
<b>Allilaminok</b>	A szkvalén-oxidáz gátlása által csökkentik az ergoszterol bioszintézist.	Lokális kezelésre nem reagáló kután dermatofiton fertőzésekre.
Terbinafin		
<b>Morpholin</b>	A citokróm P450 enzimek gátlása által csökkentik az ergoszterol bioszintézist.	Onychomycosis lokális kezelésre.
Amorolfin		
<b>Nukleozid analógok</b>	DNS és RNS szintézis gátlása.	<i>Cryptococcus</i> okozta fertőzésekben és kombinációs terápiákban.
5-fluorocytosin		
<b>Azolok</b>	A citokróm P450 enzimek gátlása által csökkentik az ergoszterol bioszintézist.	Endemiás és szisztémás opportunisták mikózisok kezelésére.
<b>Imidazolok</b>		
Miconazol Ketoconazol		
<b>Triazolok</b>		
Fluconazol Itraconazol Voriconazol Posaconazol		
<b>Echinocandinok</b>	A glukán szintézis gátlása által csökkentik a sejtfaalképződést.	Candidiasis, aspergillosis kezelésére.
Micafungin Caspofungin Anidulafungin		
<b>Egyéb</b>	Mitózis gátlók.	Lokális kezelésre nem reagáló kután mikózisokban.
Griseofulvin		

## II.4.1. Poliének

### Amphotericin B

A poliének csoportjába tartozó, a *Streptomyces nodosus* által termelt amphotericin-B-deoxicolatot (AMB) ma már szintetikusán állítják elő [Ellis és mtsai. 2002, Ostorosky-Zeichner és mtsai. 2003/a]. A heptaén makrolid szer többszörösen telítetlen gyűrűjének egyik fele hidrofil, másik hidrofób tulajdonságú oldalláncokból áll [Ghannoum és mtsai. 1999, Ghannoum és mtsai. 2004]. Ez utóbbiak a gombasejt membrán ergoszteroljaihoz kötődve beágyazódnak a foszfolipid rétegekbe, ahol hidrofil részeik pórusokat képeznek, lehetővé téve az esszenciális kationok és más sejtkomponensek sejtből való koncentrációfüggő kiáramlását [Ghannoum és mtsai. 1999]. Ennek következtében a membrán permeabilitása megnő és szétesik a sejt [Ghannoum és mtsai. 1999]. A gyomor-bél traktusból fel nem szívódó lipofil szert intravénásan alkalmazzák [Pappas és mtsai. 2009].

Mivel nagyon széles spektrumú, *in vivo* és *in vitro* egyaránt hatásos sarjadzó-, fonalas- és dimorf gombákkal szemben, „gold-standard”-nak is nevezik [Pappas és mtsai. 2009].

Amellett, hogy erősen kötődik az ergoszterolhoz, az emlős sejtek szteroljaihoz (pl. koleszterolhoz) is kapcsolódik, amivel jól magyarázható toxikussága [Chapman és mtsai. 2008]. Ezek között szerepel a hidegrázás, láz, fejfájás; a legsúlyosabb a vesekárosodás, amely akár irreverzibilis is lehet [Deray és mtsai. 2002, Laniado-Laborín és mtsai. 2009]. Az újabb, LFAmB készítmények (amphotericin B lipid komplex, amphotericin B kolloid diszperzió, liposzómás amphotericin B) a klinikai hatékonyságot megőrizték, viszont a súlyosabb mellékhatásaik jelentősen csökkentek [Bowden és mtsai. 1996, Dupont és mtsai. 2002, Wingard és mtsai. 2002]. Az AMB és LFAmB készítményeket csak abban az esetben alkalmazzák invazív candidiasis kezelésére, ha nem érhető el alternatív terápia, echinocandin-, azol intolarenia vagy más antifungális szerrel szembeni rezisztencia áll fent, illetve nem *Candida*, hanem például *Cryptococcus neoformans* okozta a fertőzést [Kuse és mtsai. 2007, Mora-Duarte és mtsai. 2002, Rex és mtsai. 1994].

Az AMB rezisztencia leggyakoribb oka az ergoszterol bioszintézis megváltozása, amely következtében a plazmamembrán ergoszterol koncentrációja csökken, illetve a katalázok termelése nő, ezáltal a szerrel kapcsolatos oxidatív károsodás csökken [Pfaller és mtsai. 2012/a].

A *C. parapsilosis sensu lato in vitro* AMB rezisztenciájának aránya 2-3 % [Cantón és mtsai. 2011, Ostrosky-Zeichner és mtsai. 2003/b]. Az átlagos AMB MIC<sub>50</sub> értékek 0,13-1 µg/mL, a MIC<sub>90</sub> is hasonló tartományba esik: 0,5-1 µg/mL [Fleck és mtsai. 2007, Kuhn és mtsai. 2002/b, Marco és mtsai. 2003, Merkerova és mtsai. 2006, Ostrosky-Zeichner és mtsai. 2003/b]. A *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* AMB MIC<sub>90</sub> értékei kisebbek (0,045-1 µg/mL), mint a *C. parapsilosis sensu stricto* fajú [Lockhart és mtsai. 2008, Tavanti és mtsai. 2005]. Diekema és munkatársai [2009] az ≤1 µg/mL érzékenységi határértéket alkalmazva a vizsgált *C. orthopsilosis* izolátumok 31 %-ánál, a *C. metapsilosis* izolátumok 10 %-ánál figyelt meg AMB rezisztenciát.

A legtöbb invazív candidiasis esetén az AMB szokásos intravénás dózisa: 0,5 -0,7 mg/kg/nap, a kevésbé érzékeny *C. glabrata* és *C. krusei* okozta fertőzések kezelésekor indokolt a napi 1 mg/kg dózis alkalmazása [Pappas és mtsai. 2009]. Az LFAMB készítmények napi dózisa 3-5 mg/kg [Pappas és mtsai. 2009].

#### **II.4.2. Azol típusú antifungális szerek**

A klinikai gyakorlatban leggyakrabban használt azol típusú antimikotikumok a triazolok csoportjába tartozó: FLU, itraconazol és a harmadik generációs triazolok: a VOR és a POS [Chapman és mtsai. 2008, Pappas és mtsai. 2009].

Működési mechanizmusuk első lépése a citokróm P-450-dependens lanoszterol-14- $\alpha$ -demetiláz enzim gátlása, amely enzim a lanoszterol ergoszterollá, a gomba sejtmembránjának létfontosságú részévé történő átalakításához szükséges [Carrillo-Muñoz és mtsai. 2006, Groll és mtsai. 1998]. A citokróm P-450-dependens lanoszterol-14- $\alpha$ -demetiláz enzim gátlásával az ergoszterol szintézis csökken, felhalmozódnak a toxikus hatású 14- $\alpha$ -metilált szterolok, növekszik a permeabilitás és jelentősen károsodik a sejtmembrán, végül bekövetkezik a sejtlízis és sejthalál [Carrillo-Muñoz és mtsai. 2006, Groll és mtsai. 1998, White és mtsai. 1998].

Az azolok leggyakoribb mellékhatásai a gastrointestinális tünetek (hányinger, hasüregi fájdalom, hányás, hasmenés) és a mellékvese elégtelensége [Diflucan betegájékoztató, Noxafil betegájékoztató, Sporanox betegájékoztató, Vfend betegájékoztató]. Szisztémás azol terápia esetén javasolt a májfunkció monitorozása, mivel a májműködés rendellenessége

is gyakori [Diflucan betegtájékoztató, Noxafil betegtájékoztató, Sporanox betegtájékoztató, Vfend betegtájékoztató].

A csoportba tartozó mindegyik szer gyengébb aktivitású *C. glabrata* és *C. krusei* ellen [Pappas és mtsai. 2009, Pfaller és mtsai. 2007/b].

Az azol rezisztencia leggyakoribb okai közé sorolható az ergosterol bioszintézis módosulása (ERG3 funkciójának elvesztése), a gyógyszerkötőhely módosulása (ERG11 gén mutációja), a mitokondriális diszfunkció, a gyógyszer efflux (CDR1, CDR2, MDR1), a glukán szintázok megváltozásai (FKS1, FKS2 mutációk) [Lewis és mtsai. 2012, MacCallum és mtsai. 2010, Perlin és mtsai. 2009, Pfaller. és mtsai 2012/a].

## **Fluconazol**

A fluconazol (FLU) a leggyakrabban alkalmazott azol típusú terápiás szer, amelyet profilaxisban is széleskörűen használnak [Pappas és mtsai. 2009].

Elsősorban *Candida* fajok, illetve *Cryptococcus neoformans* által okozott gombás fertőzések kezelésére alkalmazzák, főleg olyan betegek esetében, akik korábban azol terápiát nem kaptak, állapotuk enyhe, illetve mérsékelt súlyosságú és *C. glabrata* fertőzés veszélye nem áll fenn [Kullberg és mtsai. 2005, Pappas és mtsai. 2009, Rex és mtsai. 1994].

Bár fungisztatikus hatása egyértelműen bizonyított, több esetben felmerült, hogy *in vitro* és *in vivo* fajtól függően fungicid hatású is lehet (pl.: *C. parapsilosis sensu lato* ellen) [Ernst és mtsai. 2002, Mikamo és mtsai. 2000, Sohnle és mtsai. 1996].

A FLU széleskörű használatának következményeként csökkent a *C. albicans* és a *C. tropicalis* által okozott invazív fertőzések száma, azonban növekedett a másodlagos rezisztenciával rendelkező *C. glabrata* fertőzések gyakorisága [Kao és mtsai. 1999, Perea és mtsai. 2002, Pfaller és mtsai. 2004/a].

A FLU standard terápia oropharyngealis, oesophagealis és vaginalis candidiasis fertőzésekben [Goldman és mtsai. 2005, Pappas és mtsai. 2009]. A triazolok közül a legjobban penetrál a gerincvelői folyadékba és az üvegtestbe, ezért központi idegrendszeri és intraocularis *Candida* infekciók kezelésében is alkalmazzák [Pappas és mtsai. 2009].

*In vitro* érzékenységi tesztek alapján a *C. parapsilosis sensu stricto* FLU rezisztencia aránya 0-4,6 %, az átlagos MIC<sub>50</sub> értékek 0,5-1 µg/mL, míg a MIC<sub>90</sub> 1-2 µg/mL közöttiek [Cantón és mtsai. 2011, Trofa és mtsai. 2008]. A FLU egyelőre aktívnek bizonyul a *C. parapsilosis sensu lato* okozta fertőzések ellen [Pfaller és mtsai. 2007/b, Pfaller és mtsai. 2008/a, Pfaller és mtsai. 2008/d]. Több kísérletben is megfigyelték, hogy a *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* FLU MIC<sub>90</sub> értéke magasabb (2-8 µg/mL), mint a *C. parapsilosis* fajé. A *C. parapsilosis sensu lato* fajok általában érzékenyek a FLU szerrel szemben, bár az eddig vizsgált izolátumok száma nem túl nagy és a kapott eredmények egy része sokszor ellentmondásos [Lockhart és mtsai. 2008]. Egyes kutatók a *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* esetében nem észleltek FLU rezisztenciát, míg mások három *C. metapsilosis* izolátum esetében viszont igen [Chen és mtsai. 2010, Lockhart és mtsai. 2008, Tavanti és mtsai. 2005]. Diekema és munkatársai [2009] 102 vizsgált izolátum közül egy *C. orthopsilosis* izolátum esetében detektált FLU rezisztenciát (64 µg/mL).

Nguyen és munkatársai [1996] a '90-es években megfigyelték, hogy a *C. parapsilosis sensu lato* volt a leggyakoribb fertőzést okozó faj FLU kezelés során jelentkező áttöréses (breakthrough) candidaemia esetén.

A FLU ajánlott napi dózisa 800 mg (12 mg/kg) majd 400 mg (6 mg/kg) invazív candidiasis esetén [Pappas és mtsai. 2009].

## **Voriconazol**

A voriconazol (VOR), amely szerkezetileg a FLU származéka, a penész- és élesztőgombákkal szemben szélesebb hatásspektrummal rendelkezik, sőt hatásos lehet FLU rezisztens *Candida* fajok esetén is, bár keresztrezisztenciáról is beszámoltak [Jhonson és mtsai. 2003, Pappas és mtsai. 2009, Pfaller és mtsai. 2002]. Az *Aspergillus* fajok nagy részével szemben fungicid, míg a *Candida* fajok és a *C. neoformans* ellen fungisztatikus hatású, viszont hatástalan *C. guilliermondii* és *C. famata* fajok okozta fertőzések terápiájában [Jhonson és mtsai. 2003, Sabatelli és mtsai. 2006].

Elsődleges terápiaként invazív candidiasis esetén nem javasolt, ennek oka a szer kiszámíthatatlan farmakokinetikája, a gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatások és a gyenge gyógyszer tolerancia [Jhonson és mtsai. 2003]. Ehelyett inkább FLU rezisztens *Candida* fajjal

fertőzött, klinikailag stabil betegek intravénás AMB és echinocandin kezelésnek kitűnő orális alternatívája [Pfaller és mtsai. 2002].

A *C. parapsilosis sensu lato* VOR MIC<sub>50</sub> ( $\leq 0,03$   $\mu\text{g/mL}$ ) és MIC<sub>90</sub> ( $\leq 0,03-0,12$   $\mu\text{g/mL}$ ) értékei általában alacsonyak [Fleck és mtsai. 2007, Mallie és mtsai. 2005, Messer és mtsai. 2006, Ostrosky-Zeichner és mtsai. 2003/b, Pfaller és mtsai. 1998]. Az *in vitro* VOR rezisztencia ritka, de keresztrezisztencia előfordulhat más azokkal szemben [Pfaller és mtsai. 2003/a-b].

Felnőttek tanácsolt orális dózisa napi kétszer 400 mg, majd 200 mg [Pappas és mtsai. 2009]. Intravénás adagoláskor 12 óránként 6 mg/kg, majd fenntartó dózisként szintén 12 óránként 3-4 mg/kg [Pappas és mtsai. 2009].

### **Posaconazol**

A posaconazol (POS) invazív aspergillózisban szenvedő betegek kezelésére hagyták jóvá [Farowski és mtsai. 2007, Nagappan és mtsai. 2007, Pappas és mtsai. 2009]. Hatásspektruma a VOR-hoz hasonló, de aktív egyben *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *A. terreus*, *Penicillium*, valamint *Histoplasma capsulatum* esetén is [Diekema és mtsai. 2007, Nagappan és mtsai. 2007].

A *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. guilliermondii* ellen fungisztatikus hatású [Sóczó és mtsai. 2007/a-b]. Fungicid is lehet *C. krusei*, *C. inconspicua*, *C. lusitaniae* és *C. kefyr* esetében és hatásos lehet a FLU rezisztens *C. albicans* izolátumokkal szemben [Majoros és mtsai. 2008, Sóczó és mtsai. 2007/b]. A többi triazolal keresztrezisztencia ritkábban fordul elő [Xiao és mtsai. 2004].

A POS-ra is általában a többi azol antifungális szernél megfigyelhető mellékhatások jellemzőek, specifikus mellékhatást még nem írtak le [Cornely és mtsai. 2007, Raad és mtsai. 2006, Ullmann és mtsai. 2007]. Kizárólag orális formában kapható, amely ajánlott dózisa 200 mg naponta négyszer vagy 400 mg naponta kétszer [Pappas és mtsai. 2009].

### **II.4.3. Echinocandinok**

A ma kereskedelmi forgalomban lévő három, szisztémás kezelésben alkalmazott szer: az anidulafungin (ANI), a caspofungin (CAS) és a micafungin (MICA) [Pappas és mtsai. 2009, Pfaller és mtsai. 2011/d].

Az echinocandinok N-acil alifás vagy aril-zsírsvav oldallánccal rendelkező lipopeptid antimikotikumok, amelyek hatásukat, a gombasejt falát alkotó  $\beta$ -(1,3)-D-glukán szintézist végző 1,3- $\beta$ -glukán-szintetáz nem-kompetitív gátlásán keresztül fejtik ki, így csökken a sejtfa szintézise, instabillá teszik a gombasejt merev sejtfaát, amely végül a sejt pusztulásához vezet [Cappelletty és mtsai. 2007, Chandrasekar és mtsai. 2006, Deresinski és mtsai. 2003, Messer és mtsai. 2006, Vazques és mtsai. 2005].

Az echinocandinokat oesophagealis és invazív candidiázis, valamint egyéb, terápiára nem reagáló aspergillózis kezelésére sikeresen alkalmazzák [de Wet és mtsai. 2004, Krause és mtsai. 2004, Kuse és mtsai. 2007, Mora-Duarte és mtsai. 2002, Pappas és mtsai. 2007, Reboli és mtsai. 2007, Villanueva és mtsai. 2001, Villanueva. és mtsai 2002]. Bizonyított, illetve gyanított invazív candidiasis esetén elsővonalbeli szerek, kevés gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatásuk és kitűnő tolerálhatóságuk miatt [Pappas és mtsai. 2009].

A *Candida* fajokkal szemben koncentráció-függő fungicid hatást mutatnak, míg az *Aspergillus* fajok ellen fungisztatikus hatásúak; a *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. guilliermondii* ellen is csak gyenge fungisztatikus hatásúnak bizonyulnak [Glöckner és mtsai. 2012, Ingham és mtsai. 2012, Pfaller és mtsai. 2004/b, Pfaller és mtsai. 2006/b]. A *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* és *C. kefyr* a CAS-nal szemben érzékenyebb (MIC<sub>90</sub>: 0,03-0,06  $\mu$ g/mL) [Pfaller és mtsai. 2006/b]. A *C. parapsilosis sensu lato* és *C. guilliermondii* fajok esetében ez az érték sokkal nagyobb (MIC  $\geq$  2  $\mu$ g/mL) [Pfaller és mtsai. 2004/b].

Mindegyik echinocandint naponta egyszer intravénásan adagolják, a CAS esetében 70 mg majd 50 mg, az ANI esetében 200 mg majd 100 mg, a MICA esetében pedig 100 mg mennyiségként, azaz az első nap a CAS és MICA esetében telítő dózis alkalmazása szükséges [Pappas és mtsai. 2009].

Keresztrezisztencia nem figyelhető meg más antifungális szerekkel szemben, illetve klinikai izolátumok esetén is csak hosszabb ideig tartó kezelés után észleltek rezisztencia kifejlődést [Denning és mtsai. 2003].

Toxicitásuk minimális, igen specifikusak, mivel az emlős sejtekben nem található glukán [Denning és mtsai. 2003, Letscher-Bru és mtsai. 2003]. A leggyakoribb mellékhatások a láz valamint az infúzió miatti phlebitis [Sable és mtsai. 2002].

Az echinocandinok közül a CAS hatásos a *C. parapsilosis sensu lato* fajok okozta fertőzésekben, bár a MIC<sub>90</sub> értékek a *Candida albicans*-hoz (0,125 µg/mL) képest akár 8-32-szer magasabbak is lehetnek ( $\geq 2$  µg/mL) [Barchiesi és mtsai. 2006, Barchiesi és mtsai. 2007, Fleck és mtsai. 2007, Kuhn és mtsai. 2002/a, Ostrosky-Zeichner és mtsai. 2003/b]. Garcia-Effron és munkatársai [2008] kimutatták, hogy a prolint alanin helyettesíti a „*psilosis*” csoport glükán-szintetáz enzimjének *FksI* alegységét kódoló *fksI* gén első „forró területén” (hot-spot régió) lévő 660-adik aminosavban. A *C. orthopsilosis* fajoknál a „második forró területen” izoleucin-valin csere is megfigyelhető [Chen és mtsai. 2010, Garcia-Effron és mtsai. 2008]. Ezzel jól magyarázhatóak a magasabb echinocandin MIC értékek.

Az, hogy az echinocandinok a *C. parapsilosis sensu lato* fajok megemelkedett MIC értékei ellenére *in vitro* és *in vivo* is hatásosak ezekkel a fajokkal szemben, egyrészt azzal magyarázható, hogy a szérumban echinocandin koncentrációjának csökkenése után a belső szervek echinocandin koncentrációja nem csökken [Bartizal és mtsai. 1997, Denning és mtsai. 2003, Hanada és mtsai. 2005, Kuhn és mtsai. 2002/b, Louie és mtsai. 2005, Odio és mtsai. 2004]. Ugyanakkor sikertelen echinocandin kezeléssel is beszámoltak, áttöréssel (breakthrough) *C. parapsilosis* fertőzéseket is leírtak echinocandin terápia során részesülőknél, sőt MIC feletti értékeken paradox növekedést, azaz növekedés serkentést is indukálhatnak *in vitro* [Brielmaier és mtsai. 2008, Cheung és mtsai. 2006, Fleischacker és mtsai. 2008, Shields és mtsai. 2011, Varga és mtsai. 2009].

Varga és munkatársai [2008] idő-ölés görbék alapján megfigyelték, hogy a „*psilosis*” csoport tagjai közül a *C. metapsilosis* a legérzékenyebb a CAS-nal szemben.

#### **II.4.4. 5-fluorocytosin**

A DNS szintézist gátló 5-FC egy fluor tartalmú pirimidin-származék, amely a citozin-permeáz enzim segítségével a gombasejtbe jut, ahol a citozin-deamináz 5-fluorouracillá alakítja [Francis és mtsai. 1992, Hope és mtsai. 2004]. Ez az UMP-pirofoszforiláz segítségével 5-fluorouridilsavvá módosul és a molekula tovább foszforilálódva az uracil helyére beépül az RNS-be, amely következtében a fehérje szintézise módosul [Hope és mtsai. 2004, Waldorf és mtsai. 1983]. Az 5-fluorouracil 5-fluorodeoksiuridin-monofoszfáttá is átalakul, amely a DNS szintézisben és magosztódásban fontos szerepet játszó timidilát-szintetáz gátolva korlátozza a timidin készletet [Hope és mtsai. 2004].

A szer gombaellenes hatása főleg a *Candida* fajokra és a *Cryptococcus neoformans*-ra korlátozódik [Lockhart és mtsai. 2011]. A monoterápia során gyorsan fellépő rezisztencia miatt általában valamilyen másik antifungális szerrel (AMB, FLU) kombinálva alkalmazzák, főleg a sarjadzó gombák okozta endocarditis vagy meningitis kezelésében [Pappas és mtsai. 2009].

A legtöbb *Candida* fajjal szemben fungisztatikus hatást fejt ki [Lewis és mtsai. 2000]. Az 5-FC fungicid hatása izolátum- és fajfüggő, amelyet a *C. lusitaniae* és *C. inconspicua* fajok esetén figyeltek meg [Ernst és mtsai. 2002, Larsen és mtsai. 1996, Majoros és mtsai. 2005, Medoff és mtsai. 1980].

Rezisztenciát észleltek *S. cerevisiae*, *C. krusei*, de *C. albicans*, *C. glabrata* és *Cryptococcus neoformans* fajoknál is [Hope és mtsai. 2004, Kern és mtsai. 1991, Pujol és mtsai. 2004]. Az 5-FC rezisztencia a *C. parapsilosis sensu lato* fajok esetén 2-6,4 % közötti [Ostrosky-Zeichner és mtsai. 2003/b, Quindos és mtsai. 2004].

Az 5-fluorocytoszin magzatkárosító hatású, alkalmazása szédüléssel, hányingerrel, hányással, gastrointestinális tünetekkel, hajhullással, fényérzékenységgel valamint máj-, csontvelőkárosodással és reverzibilis vérképzési zavarokkal járhat [Francis és mtsai. 1992, Heidemann és mtsai. 1992].

Ez a szer is csak orális formában kapható, amelynek szokásos dózisa normális vesefunkció esetén naponta négyszer 25 mg/kg [Pappas és mtsai. 2009].

## **II.5. Az antifungális érzékenység meghatározása**

### **II.5.1. *In vitro* módszerek**

#### **II.5.1.1. Standard mikrodilúció**

A sarjadzó gombák MIC értékeit az antifungális szerek iránt jelenleg két standard módszerrel is meghatározhatjuk. Az egyik eljárást az amerikai CLSI (Clinical Laboratory and Standards Institute, amely 2005-ig NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards néven volt ismert) írta le és már többször módosította (M27-A2, M27-A3); a másikat az európai EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) dolgozta ki, amely tulajdonképpen a CLSI módszer átalakított változata [EUCAST definitive document EDef 7.1 2008, EUCAST technical note on fluconazole 2008, EUCAST technical note on voriconazole 2008, NCCLS M27-A2 2002, NCCLS M44-A2 2004]. A két eljárással 24 órás inkubálással kapott, klinikai szempontból is használható eredmények lényegében nem térnek el egymástól [EUCAST technical note on fluconazole 2008, EUCAST technical note on voriconazole 2008, Pfaller és mtsai. 2010/c, Pfaller és mtsai. 2011/a és d].

A vizsgálatra 96 üregű Elisa-lemez használandó, amely üregei RPMI-1640 folyékony táptalajt és a kérdéses antifungális szer különböző koncentrációjú mennyiségeit tartalmazza. A lemezt a vizsgált gombafajjal (kezdő csíraszám CLSI:  $0,5-2,5 \times 10^3$  CFU/mL, EUCAST:  $0,5-2,5 \times 10^5$  CFU/mL) való beoltása után 24-48 óráig inokubálják (CLSI: 24-48 h, EUCAST: 24 h) [NCCLS M27-A2 2002, CLSI M27-A3 2008, M27-S3 2008]. A MIC érték leolvasásakor részleges gátlásnak kell megvalósulnia (24 órás, 80 % csökkenés spektrofotometriás, 50 % csökkenés vizuális leolvasáskor) az azolok, az 5-FC és az echinocandinok esetén; az AMB vizsgálatok pedig teljes gátlásnak (48 órás) [Pfaller és mtsai. 2008, Rex és mtsai. 2001]. A leolvasás a CLSI módszer alapján vizuálisan, az EUCAST szerint spektrofotometriásan történik [Pfaller és mtsai. 2010/c].

#### **II.5.1.2. E-teszt**

A módszer az agardiffúzió elvén alapul, lényege hogy a vizsgálandó mikroorganizmussal beoltott szilárd táptalajra a kívánt antifungális szerrel átitatott, meghatározott koncentrációgrádiensű tesztcsíkot helyeznek, amely körül 24 illetve 48 órás, 35°C-on történő

inkubálás után ellipszis alakú gátlási zóna alakul ki. A MIC érték megegyezik a tesztcsík azon értékével, ahol a gátlási zóna azt elmettszi [Desnos-Ollivier és mtsai. 2008, Koga-Ito és mtsai. 2008, NCCLS M44-A2 2004, Pfaller és mtsai. 2003/c Pfaller és mtsai. 2004/c, Pfaller és mtsai. 2010/b].

Ezt az eljárást standardizálták a FLU, VOR és az echinocandin (CAS, MICA) antifungális szerekre is [Pfaller és mtsai. 2010/d, Pfaller és mtsai. 2011/a és d].

### **II.5.1.3. Idő-ölés kísérletek**

Ezt a vizsgálatot 1998-ban Klepser és munkatársai [1998] írták le és standardizálták. A tesztet 10 mL ösztérfogatú RPMI-1640, illetve AM3 táptalaj felhasználásával  $5 \times 10^5$  CFU/mL gombasejtszám, továbbá  $0,5-32 \times \text{MIC}$  koncentrációjú antifungális szer hozzáadásával kell elvégezni [Pfaller és mtsai. 2004/d]. Az ilyen módon összeállított tenyészeteket két napon át  $35^\circ\text{C}$ -on, állandó rázatás mellett inkubátorban kell kultiválni és előre meghatározott időpontokban (pl.: 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h) a sejtszámváltozás definiálása céljából mintát kell venni. A mintákat hígítás után Sabouraud táptalajra kell pipettázni és szintén  $35^\circ\text{C}$ -on inkubálni [Klepser és mtsai. 1998, Pfaller és mtsai. 2004/d]. A 24 illetve 48 óra után kinőtt gombatelepek számát az idő függvényében ábrázolva hasznos információt nyerhetünk a vizsgált antifungális szer fungicid vagy fungisztatikus voltáról.

### **II.5.2. Antifungális érzékenységi kategóriák**

A CLSI és EUCAST szakemberei a MIC eloszlás, farmakokinetikai, farmakodinamikai tulajdonságok, rezisztencia mechanizmusok, valamint a klinikai kimenetel figyelembevételével határozták meg a *Candida* fajok antifungális szerekkel szembeni klinikai határértékeit (2. táblázat) [EUCAST technical note on fluconazole 2008, EUCAST technical note on voriconazole 2008, NCCLS M27-A 1997/a-b, CLSI M27-A3 2008, CLSI M27-S3 2008, NCCLS M27-A2 2002].

2. táblázat. A *Candida* fajok antifungális szerekkel szemben mutatott *in vitro* érzékenységi kategóriái a CLSI alapján [CLSI M27-A3 2008, NCCLS M27-A2 2002].

Antifungális szer	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	É*	DÉ**	MÉ***	R****
AMB	<1	-	-	-
FLU	$\leq 8$	16-32	-	$\geq 64$
VOR	$\leq 1$	2	-	$\geq 4$
5-FC	$\leq 4$	-	8-16	$\geq 32$
Echinocandinok	$\leq 2$	-	-	>2

É\* : érzékeny, DÉ\*\* : dózisfüggően érzékeny

MÉ\*\*\* : mérsékelt érzékeny, R\*\*\*\* : rezisztens

Az AMB esetében korábban nem állapítottak meg határértékeket, általában az 1  $\mu\text{g/mL}$  koncentrációnál nagyobb MIC értékű törzseket tekintették rezisztensnek és az általuk okozott fertőzések kezelésében magasabb, 1 mg/kg/nap dózisú AMB terápiát alkalmaztak [Diekema és mtsai. 2009, Espinel-Ingroff és mtsai. 2008, Pappas és mtsai. 2009, Rex és mtsai. 2002, Spellberg és mtsai. 2006]. Pfaller és munkatársai [2012/b] nyolc *Candida* faj esetén nemrégiben meghatározták a faj-specifikus, 24/48 órás AMB epidemiológiai határértékeket, amelyek a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* esetén: 2  $\mu\text{g/mL}/2 \mu\text{g/mL}$ , a *C. krusei* és *C. lusitaniae* esetén: 2  $\mu\text{g/mL}/4 \mu\text{g/mL}$ , a *C. dubliniensis*-é pedig:  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ . A faj-specifikus klinikai határértékek hiányában ezek az epidemiológiai határértékek jól használhatóak a kialakuló AMB rezisztencia detektálására [Pfaller és mtsai. 2012/b].

A CLSI kezdetben a FLU esetében sem adott meg faj-specifikus klinikai határértékeket és a vad típusú MIC eloszlástól függetlenül az összes faj esetében  $\leq 8 \mu\text{g/mL}$  MIC koncentrációjú érzékeny (É), 16-32  $\mu\text{g/mL}$  dózisfüggően érzékeny (DÉ), és  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  rezisztens (R) kategóriákat állapított meg (2. táblázat) [Pfaller és mtsai. 2006/a]. Az érzékenyebb fajok (*C. albicans*, *C. tropicalis*, és *C. parapsilosis*) esetén azonban a  $\leq 8 \mu\text{g/mL}$  határérték túl magasnak, az EUCAST által meghatározott  $>4 \mu\text{g/mL}$  túl alacsonynak bizonyult a kialakuló rezisztencia detektálására, amely az izolátumok nem megfelelő kategóriába való sorolását és a vizsgálat reprodukálhatóságát veszélyezteti [Arendrup és mtsai. 2009].

A faj-specifikus FLU klinikai határértékek meghatározására a CLSI a globális antifungális MIC adatbázis felhasználásával mérte fel a "vad-típusú" törzsek és a hét leggyakoribb

*Candida* faj FLU MIC értékeit [Pfaller és mtsai. 2010/c]. (Vad típusú izolátumok: azok a törzsek, amelyek a vizsgált antifungális szerrel szemben sem mutációs, sem szerzett rezisztenciamechanizmust nem mutatnak [Pfaller és mtsai. 2010/c]. Ezek az adatok a CLSI számára lehetővé tették, az epidemiológiai határértékek megállapítását (ECVs= epidemiologic cutoff values), amelyekkel eredményesebben lehet detektálni a csökkent FLU érzékenységgű törzseket, és amelyek fontos lépését jelentik a faj-specifikus klinikai határértékek meghatározásának [Pfaller és mtsai. 2012/a]. Az epidemiológiai határértékek a „vad-típusú” törzsek MIC értékének felső határát prezentálják, amelyek a „vad-típusú” izolátumok legalább 95 %-át felölelik [Pfaller és mtsai. 2010/c]. Fontos kiemelni, hogy az epidemiológiai határértékek nem mindig egyeznek meg a klinikai határértékekkel, ugyanis míg ez utóbbiakat az adott antifungális szer terápiájára valószínűleg reagáló izolátumok azonosítására használják, addig az epidemiológiai határértékekkel a szerzett antifungális rezisztenciájú törzseket detektálják [Pfaller és mtsai. 2012/a, Turnidge és mtsai. 2007].

Ezek és a molekuláris, farmakodinamikai, valamint a klinikai adatok alapján határozták meg a *C. albicans*, *C. tropicalis* és *C. parapsilosis sensu stricto* fajokra a következő faj-specifikus FLU klinikai határértékeket: É  $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$ , MÉ  $4 \mu\text{g/mL}$ , R  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$  (3. táblázat) [Pfaller és mtsai. 2010/c-d, Pfaller és mtsai. 2011/c]. Ezek az érzékenységi koncentrációértékek megegyeznek az EUCAST értékeivel [Pfaller és mtsai. 2010/c, Pfaller és mtsai. 2011/d]. Az EUCAST szervezettel szemben, a CLSI a *C. glabrata* faj esetében a FLU MÉ kategóriát  $\leq 32 \mu\text{g/mL}$ , a R kategóriát  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  koncentrációkban határozta meg, É kategóriát pedig nem adtak meg (3. táblázat) [Pfaller és mtsai. 2011/d]. Megjegyzendő, hogy az EUCAST nem ajánlja a FLU-t a *C. glabrata* fertőzések kezelésére, ezért ezen faj esetében határértékeket sem állapítottak meg, elkerülve ezzel az esetleges terápiás sikertelenséget FLU kezelés során [Pfaller és mtsai. 2011/d].

3. táblázat. Faj-specifikus fluconazol (FLU) érzékenységi kategóriák [Pfaller és mtsai. 2010/c-d, Pfaller és mtsai. 2011/c].

<i>Candida</i> faj	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	É*	MÉ**	R***
<i>C. albicans</i>	$\leq 2$	4	$\geq 8$
<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	$\leq 2$	4	$\geq 8$
<i>C. tropicalis</i>	$\leq 2$	4	$\geq 8$
<i>C. glabrata</i>	-	$\leq 32$	$\geq 64$

É\* : érzékeny, MÉ\*\* : mérsékelten érzékeny, R\*\*\* : rezisztens

Ehhez hasonlóan a *C. glabrata* és *C. krusei* kivételével meghatározták a *Candida* fajok VOR klinikai határértékeket is: É  $\leq 0,125$   $\mu\text{g/mL}$ , MÉ: 0,25-0,5  $\mu\text{g/mL}$  és R  $\geq 1$   $\mu\text{g/mL}$  (4. táblázat), amelyek jelentősen alacsonyabbak a korábbi értékekhez képest (2. táblázat) [Pfaller és mtsai. 2011/a].

A *C. krusei* esetében  $\leq 0,5$   $\mu\text{g/mL}$  É és  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$  R klinikai határértékeket adtak meg (4. táblázat) [Pfaller és mtsai. 2011/a]. A *C. glabrata* faj VOR-ra való gyenge klinikai reagálása, valamint a VOR MIC és a terápiás siker közötti összefüggés hiánya miatt, a CLSI a klinikai határérték helyett  $\leq 0,5$   $\mu\text{g/mL}$  epidemiológiai határérték alkalmazása mellett döntött, amellyel a „vad típusú” és „nem vad típusú” törzsek tökéletesen elkülöníthetőek egymástól [Pfaller és mtsai. 2011/a].

4. táblázat. Faj-specifikus voriconazol (VOR) érzékenységi kategóriák [Pfaller és mtsai. 2011/a].

<i>Candida</i> faj	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	É*	MÉ**	R***
<i>C. albicans</i>	0,125	0,25-0,5	$\geq 1$
<i>C. tropicalis</i>	0,125	0,25-0,5	$\geq 1$
<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>	0,125	0,25-0,5	$\geq 1$
<i>C. krusei</i>	$\leq 0,5$	-	$\geq 2$

É\* : érzékeny, MÉ\*\* : mérsékelten érzékeny, R\*\*\* : rezisztens

Bár már korábban validálták a *Candida* fajok antifungális érzékenységének meghatározási módszereit (E-teszt, mikrodilúció) a POS-ra is, de klinikai határértékeket nem állapítottak meg, ezért ezen antifungális szer esetében a régebbi FLU vagy VOR határértékeket alkalmazták (2. táblázat) [Diekema és mtsai. 2007, Pfaller és mtsai. 2008/a]. Faj-specifikus POS klinikai határértékeket azóta sem állapítottak meg, viszont a POS rezisztencia detektálására alkalmazható epidemiológiai határértékeket igen [Pfaller és mtsai. 2011/b]. Ezek a következők: 0,06  $\mu\text{g/mL}$  a *C. albicans*, 2  $\mu\text{g/mL}$  a *C. glabrata*, 0,25  $\mu\text{g/mL}$  a *C. parapsilosis sensu stricto* és a *C. kefyr*, 0,12  $\mu\text{g/mL}$  a *C. tropicalis* és a *C. lusitaniae*, 0,5  $\mu\text{g/mL}$  a *C. krusei* és a *C. guilliermondii* fajok esetén [Pfaller és mtsai. 2011/b].

Faj-specifikus klinikai határértékeket az 5-FC esetében sem határoztak meg korábban. Nemrégiben viszont, szintén nyolc *Candida* faj esetén megállapították ezen antifungális szer 24/48 órás faj-specifikus epidemiológiai határértékeit. A *C. albicans*, *C. tropicalis*, és *C.*

*lusitaniae* esetén: 0,5 µg/mL/1 µg/mL, a *C. glabrata*, *C. parapsilosis sensu stricto* és *C. dubliniensis* esetén: 0,5 µg/mL/0,5 µg/mL, a *C. krusei* esetén: 32 µg/mL/32 µg/mL, a *C. guilliermondii* esetén pedig: 1 µg/mL/- értékeket adták meg [Pfaller és mtsai. 2012/b]. Ezek színén jól alkalmazhatóak a kialakuló rezisztencia detektálására [Pfaller és mtsai. 2012/b].

A *Candida* fajokra a CLSI korábban  $\leq 2$  µg/mL É és  $>2$  µg/mL NÉ (nem érzékeny) echinocandin klinikai határértékeket definiált (2. táblázat) [Pfaller és mtsai. 2008/c]. Ezek megállapításakor bár a farmakodinamikai, farmakokinetikai tulajdonságokat és rezisztens mutációkat is figyelembe vették, azonban az akkori MIC adatok alapján és a rezisztens izolátumok hiánya miatt egy addig ismeretlen, a nem érzékeny kategóriát vezették be.

Azóta kimutatták azt, hogy az *FKSI/FKS2* mutáció miatti rezisztens fajok MIC értéke nem feltétlenül nagyobb a „vad-típusú” izolátumok 2 µg/mL koncentrációjú klinikai határértékénél [Garcia-Effron és mtsai. 2009, Perlin és mtsai. 2007, Pfaller és mtsai. 2011/d]. Ezek a tények ösztönözték a szakembereket a faj-specifikus klinikai határértékek létrehozására az echinocandinok esetén is [Pfaller és mtsai. 2011/d].

A *C. albicans*, *C. tropicalis*, és *C. krusei* klinikai érzékenységi határértékeként  $\leq 0,25$  µg/mL, a *C. parapsilosis sensu stricto* és *C. guilliermondii* fajok esetében  $\leq 2$  µg/mL koncentráció értéket állapítottak meg (5. táblázat). A *C. glabrata* MICA érzékeny kategóriájába a  $\leq 0,06$  µg/mL MIC értékű izolátumokat sorolják, míg az ANI és CAS esetében a  $\leq 0,12$  µg/mL MIC koncentrációjú fajok tartoznak ide.

Az  $\geq 1$  µg/mL ( $\geq 0,25$  µg/mL (MICA) vagy  $\geq 0,5$  µg/mL (ANI, CAS) *C. glabrata* esetén) MIC koncentrációjú *C. albicans*, *C. tropicalis* és *C. krusei* izolátumok klinikailag rezisztensnek tekinthetőek a szerzett FKS mutációjuk miatt [Pfaller és mtsai. 2011/d]. A *C. parapsilosis sensu stricto* és *C. guilliermondii* fajok  $\geq 8$  µg/mL MIC koncentrációértéken tekintendőek rezisztensnek [Pfaller és mtsai. 2011/d].

5. táblázat. Faj-specifikus caspofungin (CAS) érzékenységi kategóriák [Pfaller és mtsai. 2011/d].

<i>Candida</i> faj	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	É*	MÉ**	R***
<i>C. albicans</i>	$\leq 0,25$	0,5	$\geq 1$
<i>C. tropicalis</i>	$\leq 0,25$	0,5	$\geq 1$
<i>C. krusei</i>	$\leq 0,25$	0,5	$\geq 1$
<i>C. glabrata</i>	$\leq 0,12$	0,25	$\geq 0,5$
<i>C. parapsilosis</i> <i>sensu stricto</i>	$\leq 2$	4	$\geq 8$
<i>C. guilliermondii</i>	$\leq 2$	4	$\geq 8$

É\* : érzékeny, MÉ\*\* : mérsékelten érzékeny, R\*\*\* : rezisztens

### III. Célkitűzések

Mivel a jelenlegi szakirodalomban kevés információ olvasható a nemrég elkülönített *Candida orthopsilosis* és *Candida metapsilosis* fajok *in vitro* és főleg *in vivo* antifungális érzékenységéről, továbbá terápiás ajánlás sem létezik az általuk okozott fertőzések kezelésére, ezért munkánkban célul tűztük ki:

- az amphotericin-B, 5-fluorocytosin, fluconazol, voriconazol, posaconazol és a caspofungin minimális gátló koncentrációjának meghatározását (*in vitro* mikrodilúciós módszer) a *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* és *Candida metapsilosis* fajokkal szemben, majd ezek ismeretében,
- az amphotericin-B, 5-fluorocytosin, fluconazol, voriconazol és a posaconazol *in vitro* farmakodinámiájának idő-ölés görbék általi vizsgálatát (*in vitro* makrodilúciós módszer), valamint összehasonlítását a „*psilosis*” csoporton belül,
- továbbá az amphotericin-B, fluconazol és caspofungin *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* és *Candida metapsilosis* fajokkal fertőzött neutropeniás egérmodellekben mutatott *in vivo* aktivitásának tanulmányozását és összehasonlítását,
- végül a kapott eredmények alapján azt szeretnénk volna eldönteni, hogy a *Candida parapsilosis sensu stricto* fajra érvényben lévő nemzetközi ajánlások mennyire alkalmazhatóak a *Candida orthopsilosis* és *Candida metapsilosis* okozta fertőzések kezelésében.

## IV. Anyagok és módszerek

### IV.1. A sarjadzó gombák eredete

A dolgozatban vizsgált hat *Candida parapsilosis sensu stricto*, három *Candida orthopsilosis* és négy *Candida metapsilosis* klinikai izolátumok azonosítása molekuláris biológiai módszerek segítségével korábban már megtörtént [Tavanti és mtsai. 2005]. A 6. táblázatban találhatóak a törzsek eredetével kapcsolatos legfontosabb adatok. Az olaszországi törzseket Arianna Tavanti (Universitá di Pisa, Pisa, Olaszország) bocsátotta rendelkezésünkre (*C. parapsilosis sensu stricto* CP120, CP117; *C. orthopsilosis* CP85, CP25, CP125; *C. metapsilosis* CP5, CP92, CP86). A felhasznált törzsek közül négy *C. parapsilosis sensu stricto* (9150, 509, 2845, 896/1) és egy *C. metapsilosis* (12821) a DEOEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet Diagnosztikai Laboratóriumában lett azonosítva. A kísérleteink során három ATCC referencia törzset is teszteltünk (*C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. orthopsilosis* ATCC 96139, *C. metapsilosis* ATCC 96144).

6. táblázat. A kísérletekhez felhasznált klinikai izolátumok eredete.

A klinikai izolátumok azonosítói	A beteganyag típusa	Az izolált gombafaj beszerzési helye
<i>Candida parapsilosis sensu stricto</i>		
9150	Vér	Debrecen, Magyarország
509	Légút	Debrecen, Magyarország
2845	Vér	Debrecen, Magyarország
896/1	Seb	Debrecen, Magyarország
CP120	Széklet	Pisa, Olaszország
CP117	Köröm	Pisa, Olaszország
<i>Candida orthopsilosis</i>		
CP85	Katéter	Pisa, Olaszország
CP25	Köröm	Pisa, Olaszország
CP125	Köröm	Pisa, Olaszország
<i>Candida metapsilosis</i>		
CP5	Köpet	Pisa, Olaszország
CP92	Széklet	Pisa, Olaszország
CP86	Hüvely	Pisa, Olaszország
12821	Vér	Debrecen, Magyarország

## IV.2. *In vitro* érzékenységi vizsgálatok

### IV.2.1. A minimális gátló koncentráció meghatározása

Az AMB (Sigma), 5-FC (Sigma), FLU (Pfizer), VOR (Pfizer), POS (Schering-Plough) és CAS (Merck) MIC értékeket a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) standard M27-A3 dokumentum ajánlása alapján minimum két alkalommal végeztük el [CLSI M27-A3 2008].

A FLU, 5-FC, CAS antifungális szereket steril desztillált vízben, a többi gyógyszert 100 %-os DMSO-ban oldottuk fel. Az AMB, VOR, POS, CAS antifungális szereket 0,015-8 µg/mL, az 5-FC-t és a FLU-t 0,12-64 µg/mL koncentráció határok között vizsgáltuk.

A 0,85 %-os fiziológiás sóoldatban denzitométerrel 0,5 McFarland sűrűségűre állított gombaszuszpenziók előállításához 24 órás Sabouraud-agaron tenyésztett gombatelepeket

használtunk fel, majd RPMI-1640 folyékony táptalajt alkalmaztunk a megfelelő csíraszám beállításához, amely az AMB esetében  $10^4$  CFU/mL, a többi vizsgált szer esetében  $10^3$  CFU/mL volt. A MIC meghatározáshoz használt 96 üregű Elisa-lemezekon gombakontroll (antifungális szert nem tartalmazó) és táptalajkontroll (sarjadzó gombát nem tartalmazó) üregeket is beállítottunk. A 48 (AMB, 5-FC, FLU, VOR, POS) és 24 (CAS) órán át, 35 °C-on végezett inkubálás után az üregek tartalmát pipettával összeszuszpendáltuk, majd az eredményeket szemmel leolvastuk.

#### **IV.2.1.1. Az adatok értékelése**

Az AMB MIC értéke az antifungális szer azon legkisebb koncentrációja, amely a gombakontrollhoz képest nem okoz látható növekedést (teljes gátlás), míg a többi gyógyszer MIC értéke az a koncentráció, amely a kontrollhoz képest 50 %-os csökkenést mutat (prominens gátlás) [NCCLS M27-A2 2002, Pfaller és mtsai. 2004/b, Pfaller és mtsai. 2008/c].

#### **IV.2.2. E-teszt**

Mivel az E-tesztet tekintik az AMB rezisztens *Candida* fajok legjobb detektálási módszerének, ezért az AMB MIC értékeket E-teszttel is meghatároztuk [Pfaller és mtsai. 2004/c]. Az E-teszthez 2 % glükózzal kiegészített RPMI-1640 táptalajt és 24 órás tenyészetekből 0,85 %-os fiziológiás sóoldatban elkészített, 0,5 McFarland sűrűségű gombaszuszpenziókat használtunk fel [NCCLS M27-A2 2002, Pfaller és mtsai. 2004/d]. Ezeket a szuszpenziókat steril tampon segítségével egyenletesen kikentük az RPMI tápagarak felszínére, amelyekre megszáradásuk után helyeztük el az AMB-vel átitatott tesztcsíkokat. A táptalajokat 35 °C-on, 24 és 48 órán keresztül történő inkubálás után szemmel olvastuk le [NCCLS M27-A2 2002].

#### **IV.2.3. Az idő-ölés görbék felvétele**

Az idő-ölés kísérleteket a Klepser és munkatársai [1998] által megadott standardizált módszer szerint hajtottuk végre.

Mindegyik tesztelt gomba izolátumból denzitométer segítségével  $10^5$  CFU/mL kiindulási csíraszámú szuszpenziót készítettünk RPMI-1640 folyékony tápközegben. Az antimikotikumokat (5-FC, FLU, VOR, POS)  $0,5-16 \times \text{MIC}$  koncentrációkon vizsgáltuk. A

legmagasabb AMB koncentráció az előző módszerek alapján kapott MIC értékektől függetlenül csak maximum 4 µg/mL volt, ugyanis a szérumban elérhető legnagyobb szabad AMB koncentráció 1 µg/mL-nél kisebb [Lewis és mtsai. 2003].

A táptalajt, gombaszuszpenziót, valamint a különböző mennyiségű antifungális szereket tartalmazó csöveket folyamatosan rázatva, 35 °C-os sötét termosztátban 48 óráig inkubáltuk [Klepser és mtsai. 1998]. A csövekből 0, 4, 8, 12, 24 és 48 óránként kivett 100-100 µL folyadékot, 1:10-es léptékben fiziológiás sóoldatban hígítottuk, majd ezekből a hígításokból Sabouraud-agarok felszínére 4×30 µL mennyiségű mintát cseppentettünk pipettával [Klepser és mtsai. 1998, Pfaller és mtsai. 2004/d]. Abban az esetben, amikor azt sejtettük, hogy a kinőtt telepek száma 1000 CFU/mL mennyiségnél kevesebb lesz, akkor a hígítás nélküli, tenyésztőcsőből is kioltottunk [Klepser és mtsai. 1998]. A detektálás alsó határa 50 CFU/mL [Klepser és mtsai. 1998]. Az agar lemezeket a kioltott folyadék 15-20 perces szobahőmérsékleten való száradása után inkubáltuk, majd 48 óra elteltével a kitenyészett telepeket megszámloltuk és a hígítási fokok ismeretében megállapítottuk az élő gombasejtek számát (CFU= colony forming unit), végül az így kapott csíraszámokat az idő függvényében grafikusán ábrázoltuk [Klepser és mtsai. 1998].

Az antifungális szerátvitelt (carryover) a kísérletek előtt 500 CFU/mL kezdő csíraszámmal vizsgáltuk meg, amely a különböző gyógyszer koncentrációkon tenyésztett izolátumok a kontrollhoz képest 25 %-nál nagyobb túlélő csíraszám (CFU) csökkenését; tehát a különböző gyógyszer koncentrációk (0,5-16×MIC) kezdő csíraszámot befolyásoló hatását jelenti [Klepser és mtsai. 1998, Pfaller és mtsai. 2004/d]. A táptalaj, gyógyszer és gombaszuszpenzió megfelelő mennyiségeinek összemérése után, ebből a keverékből szintén 4×30 µL-t Sabouraud-agarra oltottunk és 48 órás inkubálást követően meghatároztuk a kinőtt telepszámot [Klepser és mtsai. 1998].

Minden idő-ölés kísérletet minimum kétszer végeztünk el, a kapott eredményeket átlagoltuk. Az idő-ölés görbék készítésénél a computer curve-fitting software programot használtuk (GraphPad Prism 4.03 Windows verzió).

#### **IV.2.3.1. Az adatok értékelése**

Fungicidnek tekintettük azt a gyógyszert, amely az életképes sejtek számát (CFU) a kiindulási sejttséghez képest minimum  $\geq 99,9$  %-kal ( $\geq 3 \log_{10}$ ) csökkentette. Az ennél kisebb ( $< 99,9$  %;

<3 log<sub>10</sub>) mértékű csíraszám csökkenést okozó antifungális szereket fungisztikus hatásúnak tekintettük [Klepser és mtsai. 1998].

### **IV.3. *In vivo* érzékenységi vizsgálatok**

#### **IV.3.1. Felhasznált egerek**

A vizsgálatainkat 26-28 gramm tömegű, BALB/c típusú nőstény egerekkel végeztük el, amelyeket a „Laboratóriumi Állatok Alkalmazása és Gondozása” című Irányelv szerint tartottuk. Egy-egy egércsoportban 7-11 egér volt. Az *in vivo* kísérleti engedély száma: 12/2008 DE MÁB.

#### **IV.3.2. A BALB/c típusú egerek átmeneti neutropeniás állapotának kialakítása**

Az egereket 200 mg/kg ciklofoszfamiddal, három nappal a gombával való fertőzés előtt intraperitoneálisan immunszuppresszáltuk. A felmerülő Gram-negatív bakteriális fertőzések megakadályozása érdekében mindegyik rágcsálót a beoltástól a kísérlet végéig, subcutan 5 mg/kg ceftazidimmal kezeltünk.

#### **IV.3.3. Oltóanyag készítés**

Az oltóanyag készítéshez a három gombafaj izolátumait (*C. parapsilosis sensu stricto* 9150, 896/1, *C. orthopsilosis* CP25, CP125, CP85, *C. metapsilosis* CP5, CP92, CP86) két egymást követő napon Sabouraud agarra oltottuk, majd a felfrissített törzseket 3-4 Sabouraud táptalaj felületére szélesztettük. A kinőtt izolátumokat a táptalajok felszínéről steril vattatamponnal vettük le és steril fiziológiás sóoldatokba szuszpendáltuk, majd a szuszpenziókat négyszer 10 percig 3000g fordulaton centrifugáltuk. Mindegyik centrifugálást követően a leülepedett gombasejtekről eltávolítottuk a felülúszót és újabb, steril 20-25 mL fiziológiás sóoldatot pipettáztunk rájuk. Az utolsó centrifugálás befejeztével a felülúszótól ismét megszabadultunk és ezt követően 3 mL fiziológiás sóoldatot adtunk a gombasejtekhöz. Ebből a sejtsuszpenzióból két lépésben 1:10 arányú hígítást készítettünk, majd a fertőző dózis kívánt sejtszámát Bürker-kamrával történő számolás után állítottuk be, amely pontosságát végül kvantitatív kioltással ellenőriztük.

#### **IV.3.4. Fertőzés**

Az egerek, a fertőző gomba szuszpenziót (0,2 mL/egér) az immunszuppresszállásuk utáni negyedik napon, a farkuk oldalsó vénájába kapták. Az oltóanyag csíraszám a *C. metapsilosis* izolátumok esetén  $5 \times 10^7$  CFU/egér, a *C. orthopsilosis* és *C. parapsilosis sensu stricto* törzsek esetén kissé alacsonyabb,  $2 \times 10^7$  CFU/egér volt. Ezek a dózisok nem eredményeztek letalitást a kontroll csoportokban.

#### **IV.3.5. Antifungális terápia**

Az egerek öt napon át tartó intraperitoneális AMB (1 mg/kg/nap), FLU (1, 5, 10, 20 mg/kg/nap) és CAS (1, 2, 5 mg/kg/nap) kezelését a fertőzés után 24 órával kezdtük el.

A gyógyszerek beadott mennyisége egerenként 0,5 mL volt, a kísérletben a jelenleg humán terápiában javasolt dózisokat alkalmaztuk [Pappas és mtsai. 2009]. A kontroll csoportok 0,5 mL steril fiziológiás sóoldatot kaptak.

#### **IV.3.6. Szervtenyésztés**

A kvantitatív csíraszám meghatározás céljából a kísérlet hetedik napján életben maradt egereket cervikális diszlokációt követően felboncoltuk és a veséiket eltávolítottuk, amelyeket steril körülmények között homogenizáltuk. Egy mL steril fiziológiás sóoldatban való felvétel után, a homogenizátumokból tova futó 1:10-es léptékű hígítási sort készítettünk, ezután a megfelelő hígításokból 100 µL mennyiségeket Sabouraud agarra kioltottunk, majd 48 óras, 35 °C-os sötét termosztátban való inkubálást követően a kinőtt telepeket megszámláltuk.

#### **IV.3.7. Statisztikai adatelemzés**

A táptalajon vesékből kitenyésztett gombák esetén a szignifikancia számításhoz a Kruskal-Wallis tesztet használtuk. Szignifikánsnak a  $P < 0,05$  értékeket tekintettük.

## V. Eredmények és értékelés

### V.1. Az *in vitro* érzékenységi vizsgálatok eredményei

#### V.1.1. A minimális gátló koncentráció értékei

7. táblázat. A „*psilosis*” csoportba tartozó izolátumok amphotericin B (AMB) iránti MIC értékei.

Az izolátumok azonosítói	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	BMD	E-teszt
<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>		
ATCC 22019	2	1
9150	1	0,5
509	1	0,5
2845	0,5–1	1
896/1	1	1
CP120	1	1
CP117	1	0,5
<i>C. orthopsilosis</i>		
ATCC 96139	0,5	0,5
CP85	0,5 –2	0,5-1
CP25	0,25	0,5-1
CP125	0,5 –1	0,5
<i>C. metapsilosis</i>		
ATCC 96144	0,5	0,25
CP5	1	0,5
CP92	0,5–2	0,5-1
CP86	0,5	0,25-0,5
12821	1	0,5-1

Az amphotericin B (AMB) MIC értékeket a leveshígításos (BMD) és az E-teszt módszer esetén 48 órás inkubálási idő után olvastuk le [Szabó és mtsai. 2009].

8. táblázat. A „*psilosis*” csoportba tartozó izolátumok fluconazol (FLU), voriconazol (VOR), posaconazol (POS), 5-fluorocytoszín (5-FC) és caspofungin (CAS) minimális gátló koncentráció értékei.

Az izolátumok azonosítói	MIC (µg/mL)					
	FLU		VOR	POS	5-FC	CAS
	24 h	48 h	48 h	48 h	48 h	24 h
<b><i>C. parapsilosis sensu stricto</i></b>						
ATCC 22019	-	2	0,06	0,03–0,06	≤0,12	0,5
9150	1	2	0,12	0,12	≤0,12	1
509	-	0,5	0,06	0,06	≤0,12	0,5
2845	-	1	0,015	0,06	≤0,12	0,5-1
896/1	0,5	0,5–1	0,06	0,06	≤0,12	1
CP120	-	2	0,015	0,03	≤0,12	0,5
CP117	-	2	0,03	0,12	≤0,12	0,5-1
<b><i>C. orthopsilosis</i></b>						
ATCC 96139	-	4	0,12	0,06	≤0,12	0,12
CP85	1	4–8	0,12	0,12	≤0,12	0,12
CP25	2	8	0,12	0,06	≤0,12	0,25
CP125	0,5	8	0,06	0,03	≤0,12	0,12
<b><i>C. metapsilosis</i></b>						
ATCC 96144	-	4	0,12	0,03	≤0,12	≤0,12
CP5	2	4	0,03	0,015	≤0,12	0,25
CP92	2	8	0,03–0,06	0,015	≤0,12	0,5
CP86	1	4	0,03–0,06	0,03	≤0,12	0,25
12821	-	4	0,06	0,03	≤0,12	0,12-0,25

A fluconazol (FLU) MIC értékeket 24 és 48 órás, a voriconazol (VOR), posaconazol (POS), 5-fluorocytoszín (5-FC) MIC értékeket 48 órás, a caspofungin (CAS) MIC értékeket 24 órás inkubálási idő után olvastuk le [Szabó és mtsai. 2009, Szilágyi és mtsai. 2012].

Az ATCC tesztörzsek MIC értékei a CLSI megfelelő tartományában találhatóak [NCCLS 2002].

A CLSI és E-teszt módszerekkel kapott AMB MIC értékek  $\pm 1$  hígítási fok eltéréssel azonos eredményt adtak és a 0,25-2 µg/mL közötti koncentráció tartományba estek. Az E-teszt esetén 1 µg/mL volt a legmagasabb leolvasott érték. Ezzel a polién típusú antifungális szerrel szemben, a CLSI módszer alapján a *C. orthopsilosis* CP25, míg az E-teszt szerint a *C. metapsilosis* ATCC 96144 és CP86 törzsek bizonyultak a legérzékenyebbeknek.

A triazolokkal szemben az összes vizsgált izolátum érzékeny volt. A FLU-lal szemben a *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumok nagyobb érzékenységet mutattak (MIC: 0,5-2 µg/mL),

mint a *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* fajok (legmagasabb MIC: 8 µg/mL). A 24 órás leolvasási időpontot alkalmazva az izolátumok MIC értékei 1-4 hígítási fokkal alacsonyabbak voltak mindhárom faj esetében, mint a 48 órás leolvasási időpont után.

A VOR és POS esetében 0,015-0,12 µg/mL MIC értékeket észleltünk. A legnagyobb VOR érzékenységet (0,015 µg/mL) a *C. parapsilosis sensu stricto* 2845 és CP120-as izolátumok, a POS-nál pedig a *C. metapsilosis* CP5 (0,015 µg/mL) és CP92 (0,015 µg/mL) törzsek mutatták.

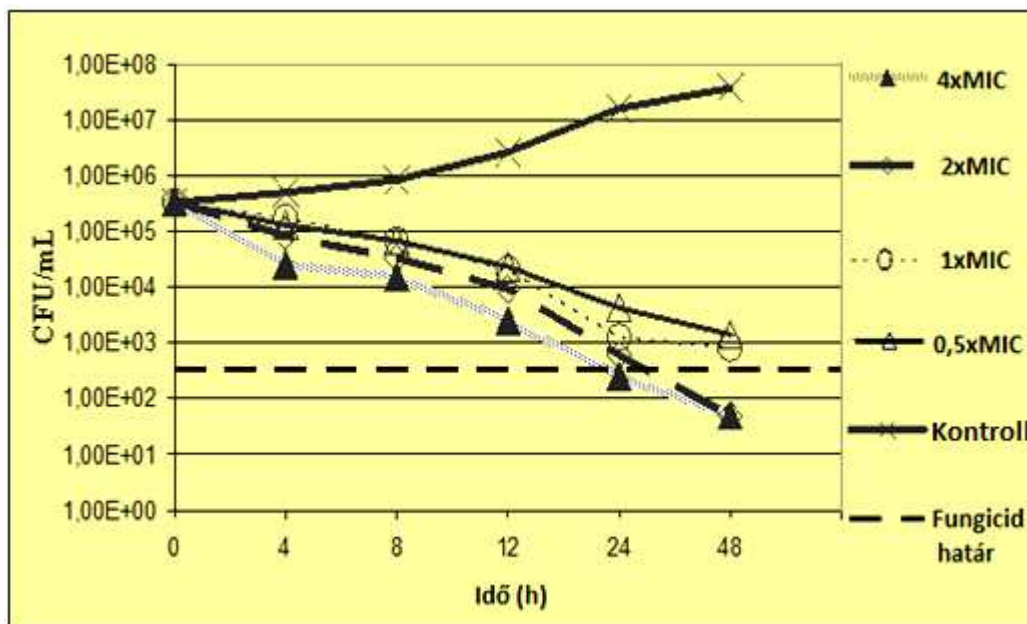
Az 5-FC MIC értékeket mindegyik tesztelt törzs esetében  $\leq 0,12$  µg/mL koncentráción figyeltük meg.

A CAS MIC értékei 24 órás leolvasás után, a két újabban elkülönített *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* faj esetében alacsonyabbak voltak (0,12-0,5 µg/mL), mint a *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumoké (0,5-1 µg/mL).

## V.1.2. Az idő-ölés kísérletek eredményei

### V.1.2.1. Amphotericin B

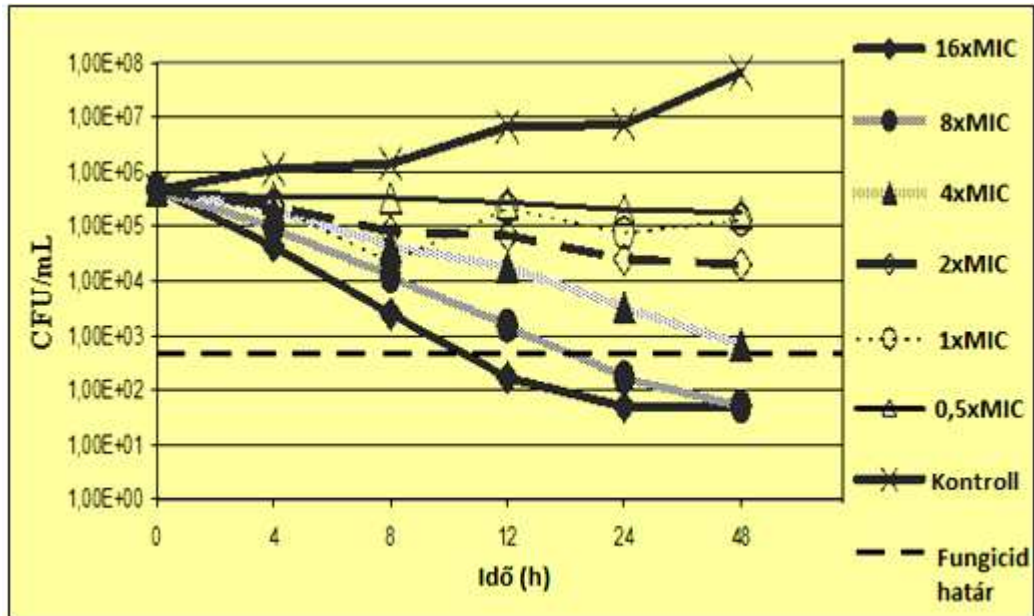
1. ábra. A CP120 *C. parapsilosis sensu stricto* izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje 0,5-4×MIC amphotericin B (AMB) esetében. AMB MIC<sub>48h</sub>: 1 µg/mL [Szabó és mtsai. 2009].



Az ATCC 22019 *C. parapsilosis sensu stricto* törzs vizsgálatakor 24 és 48 óra elteltével 1-2 µg/mL AMB koncentráció (0,5-2×MIC) már fungicid hatást okozott, viszont a 896/1 klinikai izolátum esetén kissé magasabb, 1-4 µg/mL (1-4×MIC), illetve a CP120 számú törzs ellen is csak nagyobb, 2-4 µg/mL (2-4×MIC) értékeken következett be a szer fungicid hatása.

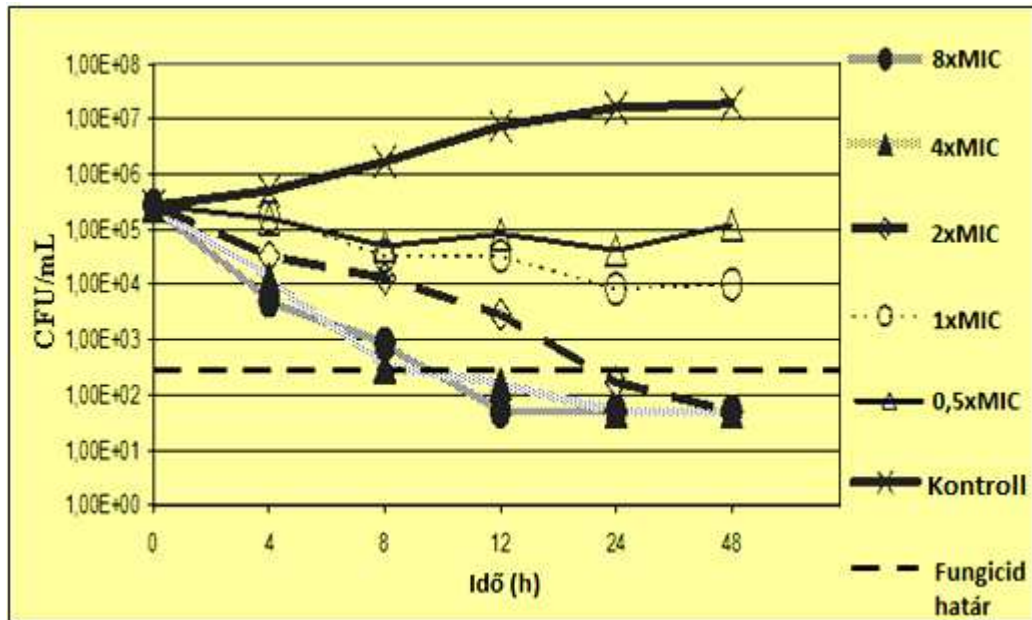
A többi *C. parapsilosis sensu stricto* izolátum (9150, 509, 2845, CP117) sejtjeit szintén csak magasabb, 4 µg/mL AMB, 48 óra inkubálási idő után pusztította el (≥99,9 %-os csíraszámcsökkenés) (1. ábra, 9. táblázat).

2. ábra. A CP25 *C. orthopsilosis* izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje 0,5-16×MIC amphotericin B (AMB) koncentráció esetében. AMB MIC<sub>24h</sub>: 0,25 µg/mL [Szabó és mtsai. 2009].



Az AMB 2-4 µg/mL (2-16×MIC) koncentrációja 24 órás inkubálási idő alatt mindegyik vizsgált *C. orthopsilosis* izolátum esetében fungicid hatást eredményezett. Az AMB a CP125-ös számú izolátum ellen volt a leghatásosabb, ugyanis a fungicid hatást már 1 µg/mL (1×MIC) koncentráción, 24 óra múlva tapasztaltuk. A CP25 *C. orthopsilosis* izolátum ellen a 8-16×MIC (2-4 µg/mL) koncentrációjú AMB már 12-24 órás inkubálás után is fungicid növekedésgátlást okozott (2. ábra, 9. táblázat).

3. ábra. A CP86 *C. metapsilosis* izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje 0,5-8×MIC amphotericin B (AMB) koncentráció esetében. AMB MIC<sub>24h</sub>: 0,5 µg/mL [Szabó és mtsai. 2009].

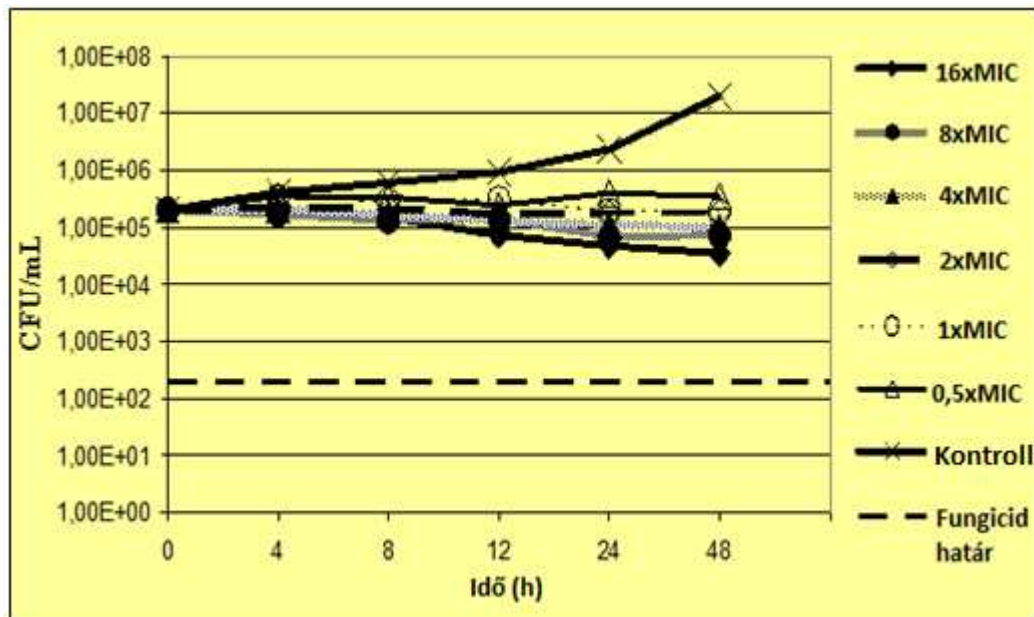


Az 1-4 µg/mL koncentrációjú AMB 48 óra inkubálási idő elteltével az öt *C. metapsilosis* izolátumból három esetében (CP92, CP86 és 12821) okozott  $\geq 99,9$  %-os csíraszámcsökkenést. A CP5 és az ATCC 96144 számú *C. metapsilosis* törzsek ellen kissé magasabb, 2-4 µg/mL (2-4×MIC) koncentráción, szintén 48 óra múlva észleltük a fungicid gátlást. A CP86-os számú *C. metapsilosis* izolátum esetében az AMB 4-8×MIC értékei már 12 óra után fungicidek voltak, amely fungicid hatás a 2×MIC koncentráció esetében 24 óra múlva következett be (3. ábra, 9. táblázat).

### V.1.2.2. 5-fluorocytosin

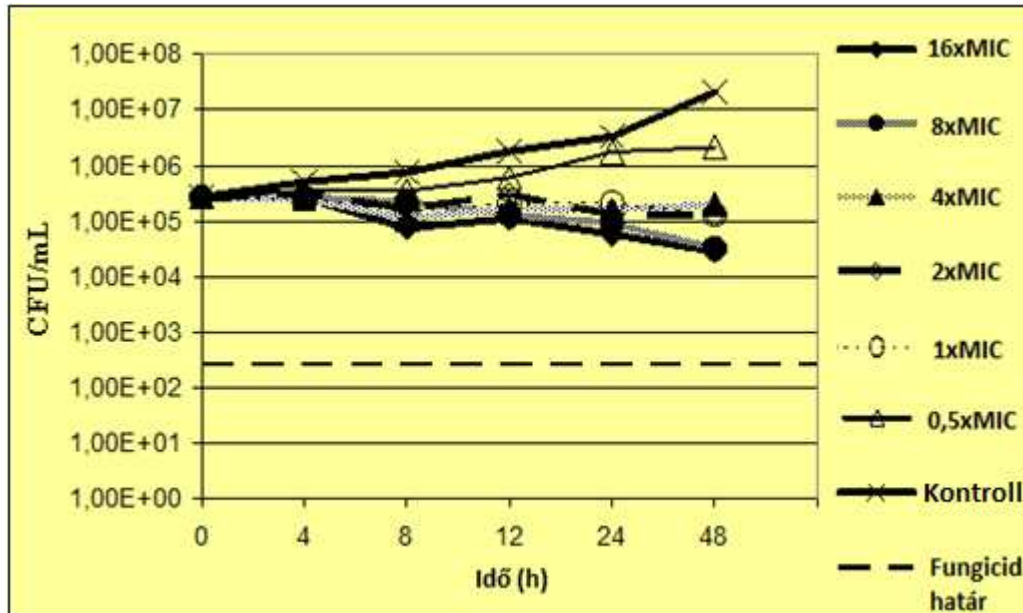
4. ábra. Az ATCC 22019 *C. parapsilosis sensu stricto* izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje 0,5-16×MIC 5-fluorocytosin (5-FC) koncentráció esetében. 5-FC MIC<sub>48h</sub>: ≤0,12 µg/mL

[Szabó és mtsai. 2009].



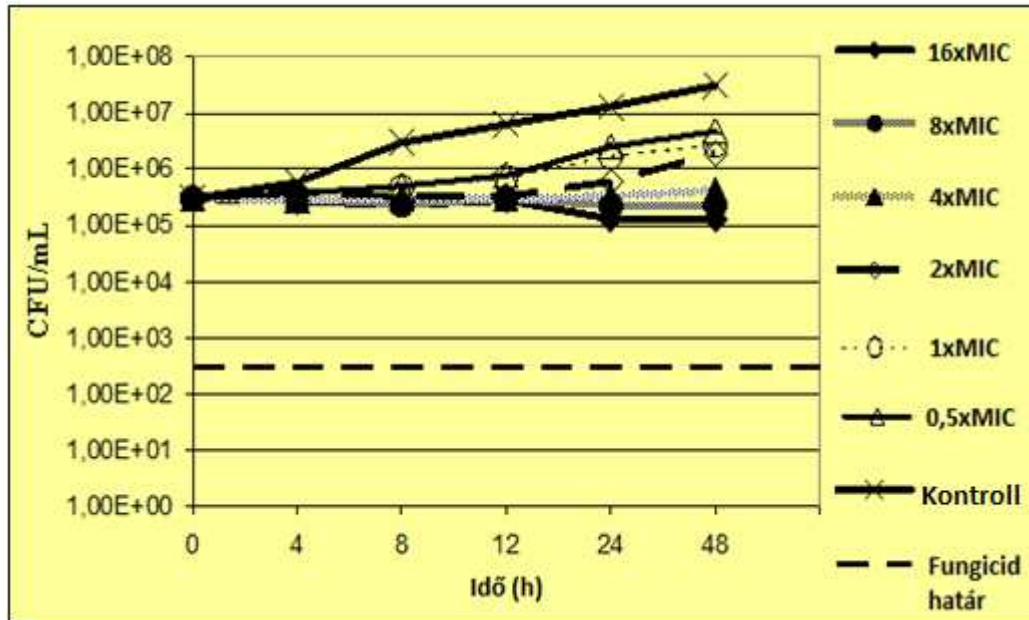
Az **5-FC** a kiindulási csíraszámhoz képest 99,9 %-nál kisebb csíraszám csökkenést, azaz fungisztikus hatást okozott a „*psilosis*” csoport mindhárom tagjának vizsgálatakor (9. táblázat). A 4. ábráról jól látható, hogy egyik vizsgált 5-FC koncentráció sem volt fungicid a *C. parapsilosis* ATCC 22019-es számú izolátummal szemben, illetve, hogy a legnagyobb mértékű csíraszám csökkenés a magasabb (8-16×MIC) koncentrációkat jellemezte; míg az alacsonyabb (0,5-2×MIC) koncentrációk kisebb mértékű növekedésgátlást eredményeztek (4. ábra, 9. táblázat).

5. ábra. A CP25 *C. orthopsilosis* izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje 0,5-16×MIC 5-fluorocytoszín (5-FC) koncentráció esetében. 5-FC MIC<sub>48h</sub>: ≤0,12 µg/mL [Szabó és mtsai. 2009].



Több, de nem mindegyik *C. orthopsilosis* (CP85, CP125) és *C. metapsilosis* (CP92, 12821) izolátum nagyobb fokú növekedésgátlása (<99,9 % csíraszám csökkenése) kissé magasabb, 2–4×MIC (0,24-0,48 µg/mL) koncentrációjú 5-FC-t igényelt. A CP25-ös számú *C. orthopsilosis* izolátum esetében a 0,5×MIC koncentrációjú 5-FC okozta a legkisebb, míg a 16×MIC koncentráció a legnagyobb mértékű csíraszám csökkenést (5. ábra, 9. táblázat).

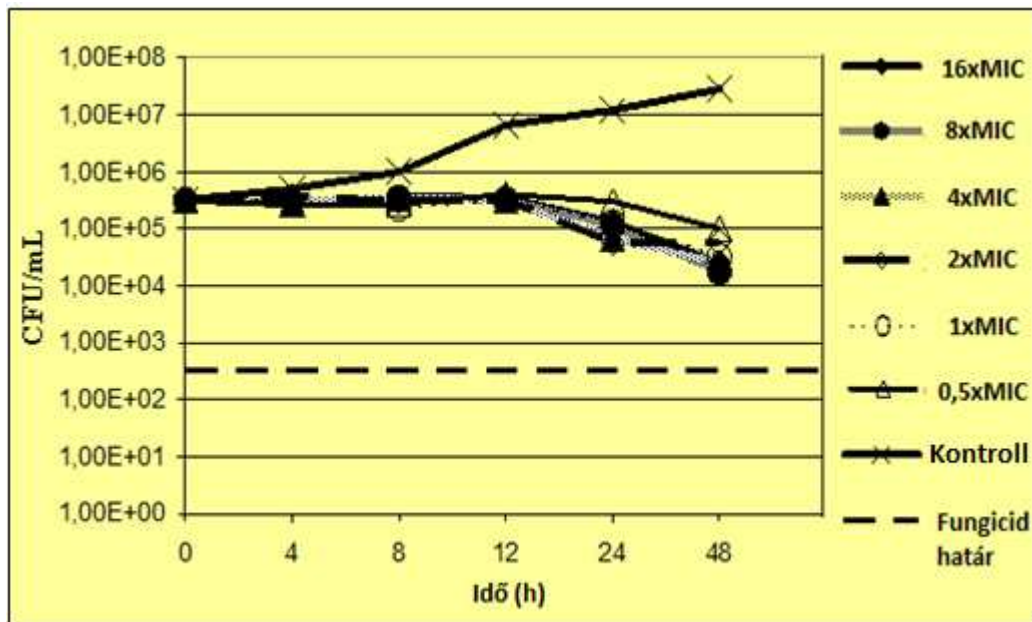
6. ábra. A 12821-es számú *C. metapsilosis* izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje 0,5-16×MIC 5-fluorocytoszin (5-FC) koncentráció esetében. 5-FC MIC<sub>48h</sub>: ≤0,12 µg/mL [Szabó és mtsai. 2009].



A „*psilosis*” csoport többi tagjához hasonlóan, az 12821-es számú *C. metapsilosis* izolátum esetében sem figyeltük meg a vizsgált 5-FC koncentrációk fungicid hatását. Az alacsonyabb 0,5-2×MIC 5-FC koncentrációk kisebb, a magasabb 8-16×MIC értékek nagyobb sejtszám csökkenést okoztak (6. ábra, 9. táblázat).

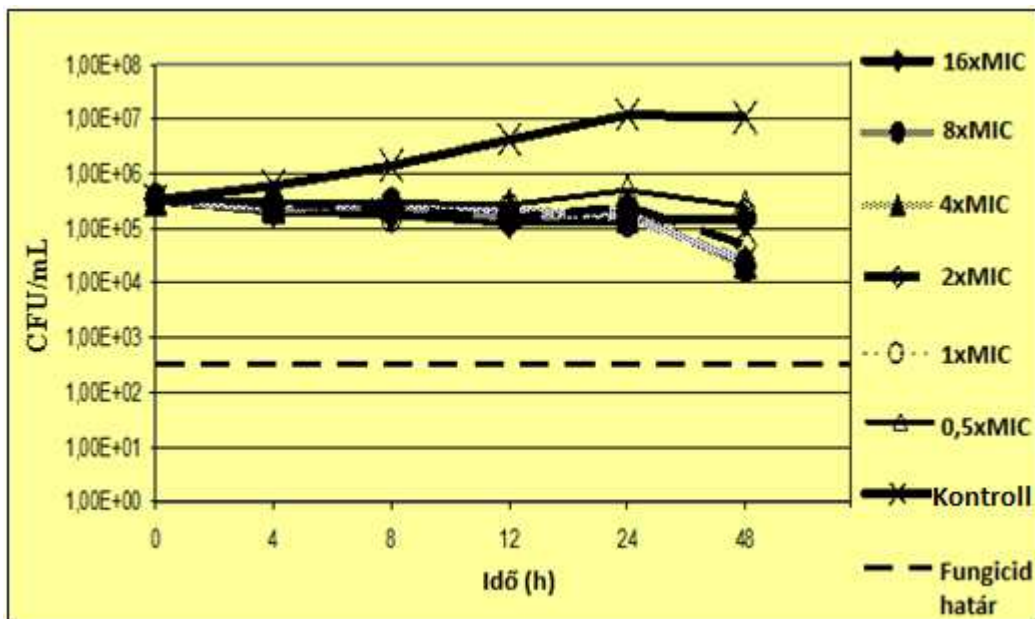
### V.1.2.3. Fluconazol

7. ábra. A CP120 *C. parapsilosis sensu stricto* izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje 0,5-16×MIC fluconazol (FLU) koncentráció esetében. FLU MIC<sub>48h</sub>: 2 µg/mL [Szabó és mtsai. 2009].



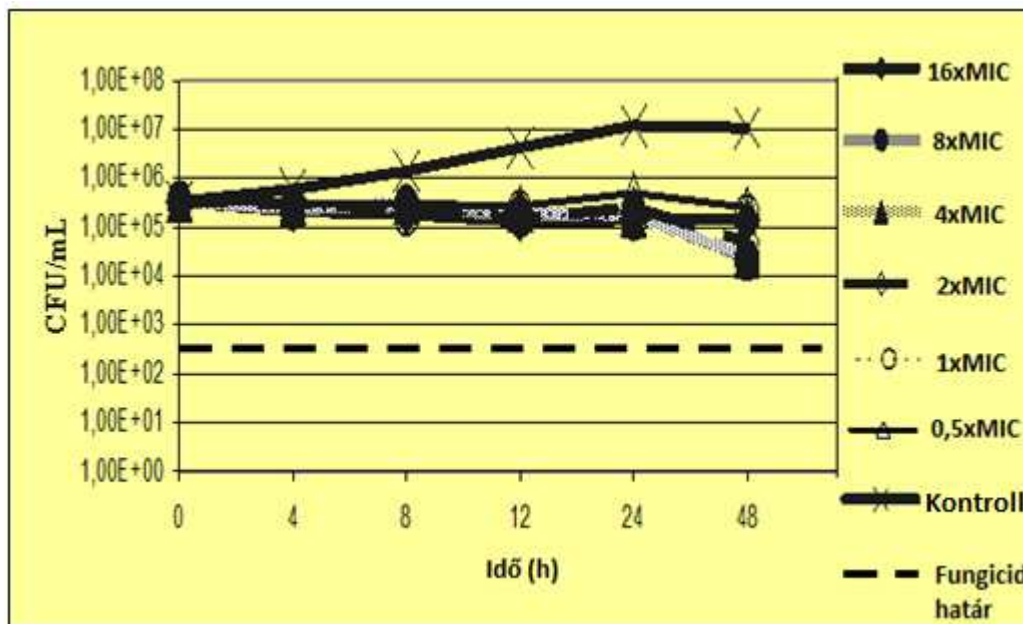
A három *Candida* faj vizsgálatok a **triazol** antifungális szerek fungisztikus hatásúak voltak, amelyet a **FLU** már  $\geq 1 \times \text{MIC}$  koncentráción produkált a *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumok ellen (7. ábra, 9. táblázat). A 7. ábráról jól látható, hogy az alacsonyabb 0,5×MIC FLU koncentráció a CP120-as számú *C. parapsilosis sensu stricto* izolátum ellen gyengébb növekedésgátlást okozott, mint a magasabb 8-16×MIC értékek.

8. ábra. A CP25 *C. orthopsilosis* izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje 0,5-16×MIC fluconazol (FLU) koncentráció esetében. FLU MIC<sub>48h</sub>: 8 µg/mL [Szabó és mtsai. 2009].



A FLU a *C. orthopsilosis* CP25 izolátumot szintén 1×MIC (8 µg/mL) koncentráción, míg a CP85, CP125 és ATCC 96139 törzsek növekedését magasabb, 2-16×MIC értékeken (16-128 µg/mL) gátolta fungisztatikusan (8. ábra, 9. táblázat).

9. ábra. A CP92 *C. metapsilosis* izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje 1-16×MIC fluconazol (FLU) koncentráció esetében. FLU MIC<sub>48h</sub>: 8 µg/mL [Szabó és mtsai. 2009].

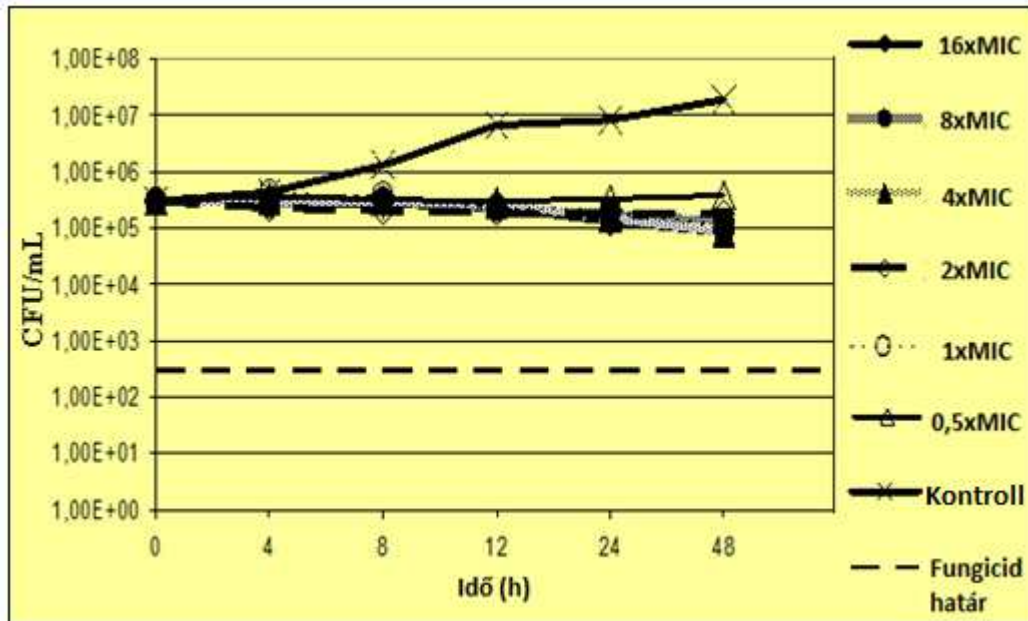


A FLU fungisztikus hatását a *C. metapsilosis* izolátumok többsége (ATCC 96144, CP5, CP86, 12821) ellen szintén 1×MIC koncentráció értéken (4 µg/mL) figyeltük meg, a CP92-es számú *C. metapsilosis* törzsnél viszont ezt a hatást, a magasabb 2×MIC (16 µg/mL) FLU mennyiség produkálta (9. ábra, 9. táblázat).

#### V.1.2.4. Voriconazol

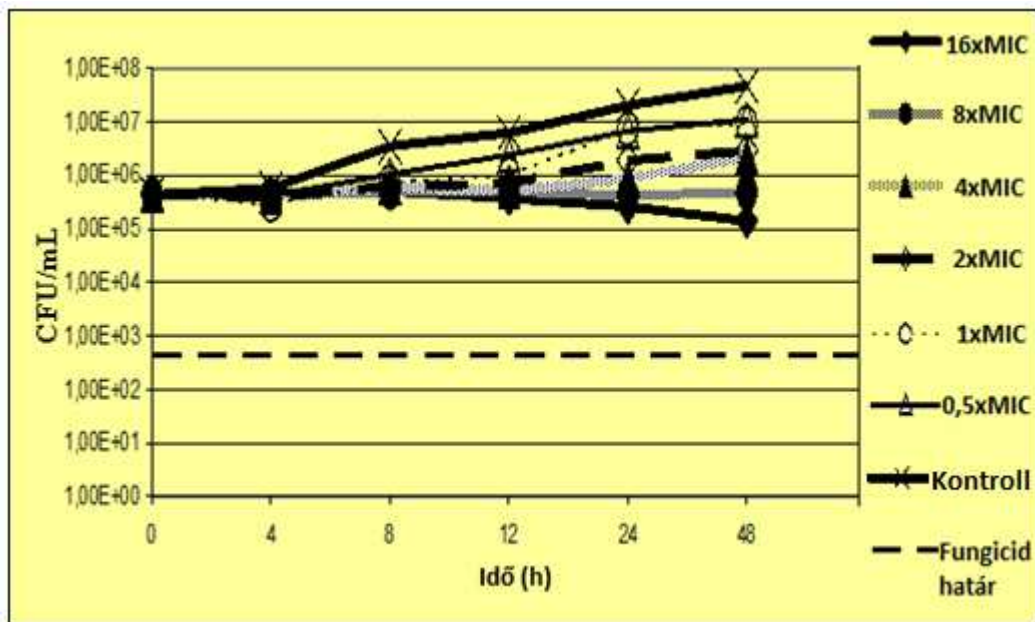
10. ábra. Az 509-es számú *C. parapsilosis sensu stricto* izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje 0,5-16×MIC voriconazol (VOR) koncentráció esetében. VOR MIC<sub>48h</sub>: 0,06 µg/mL

[Szabó és mtsai. 2009].



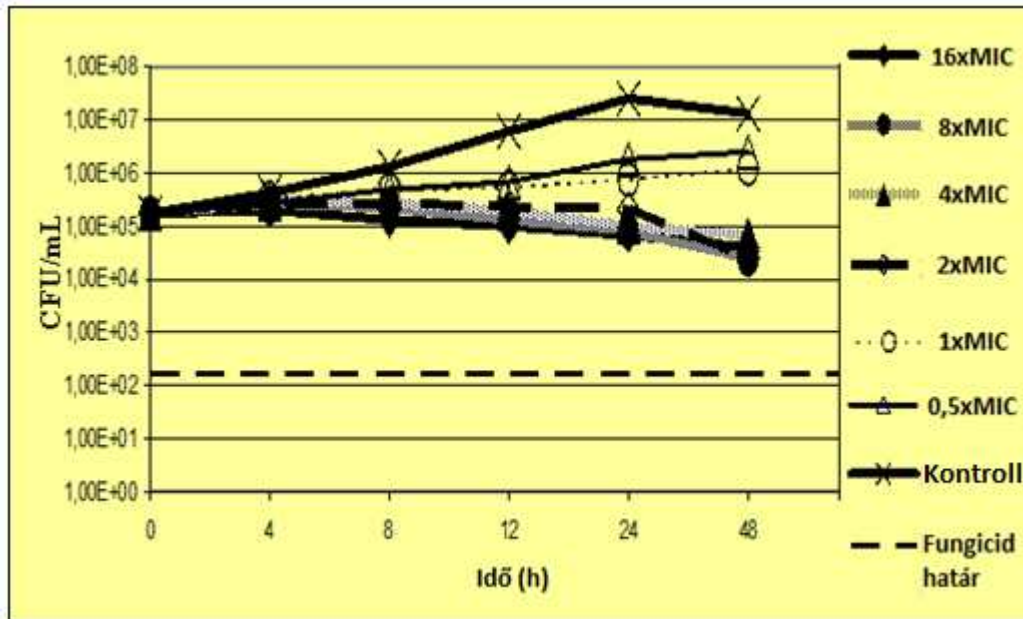
A **VOR** alacsony,  $\geq 1 \times \text{MIC}$  (0,015-0,12 µg/mL) koncentráció értékeken okozott növekedésgátlást (<99,9 %-os csíraszámcsökkenést) a *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumok vizsgálatakor (10. ábra, 9. táblázta).

11. ábra. A CP85 *C. orthopsilosis* izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje 0,5-16×MIC voriconazol (VOR) koncentráció esetében. VOR MIC<sub>48h</sub>: 0,12 µg/mL [Szabó és mtsai. 2009].



A *C. orthopsilosis* ATCC 96139, illetve a CP85 és a CP125 izolátumokat a VOR 0,5 µg/mL, illetve ennél csak magasabb, 4-8×MIC koncentrációk, míg a CP25 izolátum növekedését kisebb, 1×MIC (0,12 µg/mL) mennyiség is hatásosan gátolta (11. ábra, 9. táblázat).

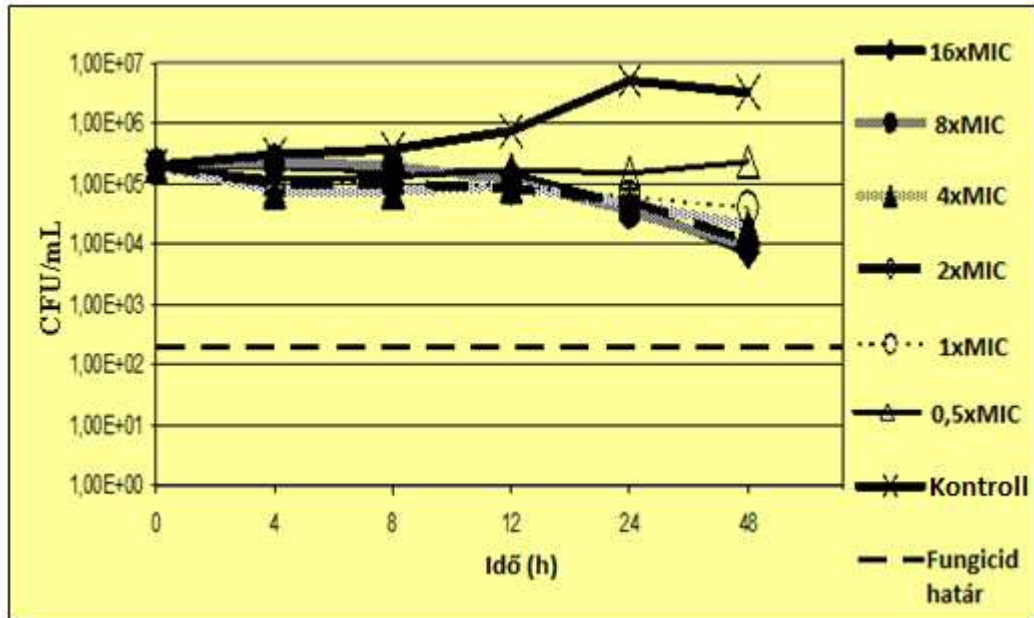
12. ábra. A CP5 *C. metapsilosis* izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje 0,5-16×MIC voriconazol (VOR) koncentráció esetében. VOR MIC<sub>48h</sub>: 0,03 µg/mL [Szabó és mtsai. 2009].



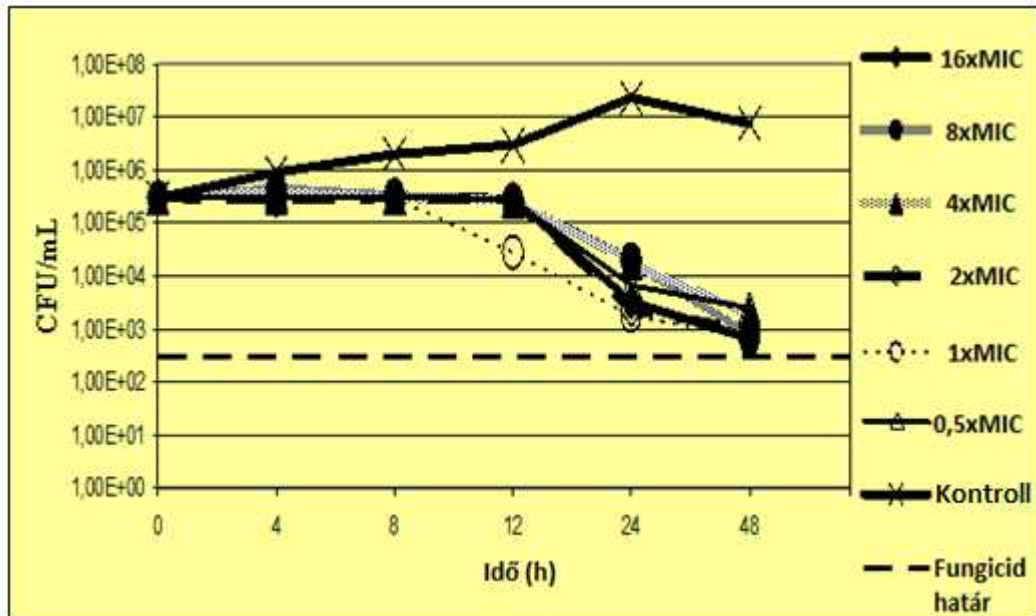
Míg a *C. metapsilosis* ATCC 96144 tesztörzs növekedését a VOR már 2×MIC (0,25 µg/mL) koncentráción gátolta, addig a többi *C. metapsilosis* izolátum szaporodását csak magasabb 4-8×MIC (0,25-0,5 µg/mL) értékű VOR mennyiség akadályozta meg és a kétszeres MIC értékű VOR koncentrációk nem okoztak jelentős fungisztikus hatást (12. ábra, 9. táblázat).

### V.1.2.5. Posaconazol

13. ábra. A CP85 *C. orthopsilosis* izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje 0,5-16×MIC posaconazol (POS) koncentráció esetében. POS MIC<sub>48h</sub>: 0,12 µg/mL [Szabó és mtsai. 2009].



14. ábra. A CP92 *C. metapsilosis* izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje 0,5-16×MIC posaconazol (POS) koncentráció esetében. POS MIC<sub>48h</sub>: 0,015 µg/mL [Szabó és mtsai. 2009].



A **POS** a *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* ATCC törzsek ellen 0,03-0,06 µg/mL, a többi klinikai izolátum ellen alacsonyabb, 0,015-0,03 µg/mL koncentrációkon okozott növekedésgátlást (<99,9 %-os csíraszámcsökkenést). A 0,25-0,5 µg/mL (4-8×MIC) POS koncentrációk a *C. orthopsilosis* CP85 és CP25, valamint a *C. metapsilosis* CP92 klinikai izolátumok vizsgálatakor nagyobb, mint 1 log<sub>10</sub> csíraszám csökkenést eredményeztek (1,2-1,48 log<sub>10</sub> és 2,22 log<sub>10</sub> CFU/mL) (13. és 14. ábra, 9. táblázat).

A *C. parapsilosis* izolátumokat POS-lal, a csoport összes tagját pedig CAS-nal szemben nem teszteltük, ugyanis ezeket az eredményeket munkacsoportunk korábban már publikálta [Sóczó és mtsai. 2007/a, Varga és mtsai. 2008].

A idő-ölés kísérletek eredményeit a 9. táblázatban foglaltam össze.

9. táblázat. Az amphotericin B (AMB), fluconazol (FLU), voriconazol (VOR), posaconazol (POS), 5-fluorocytosin (5-FC) fungicid/fungisztatikus hatásának megfelelő MIC értékek a vizsgált *Candida* fajok esetén [Szabó és mtsai. 2009].

Klinikai izolátumok	fungicid hatás <sup>1</sup>	fungisztatikus hatás <sup>2</sup>			
	AMB	FLU	VOR	POS	5-FC
<i>C. parapsilosis sensu stricto</i>					
ATCC 22019	0,5-2xMIC	≥1xMIC	≥1xMIC	≥1xMIC <sup>3</sup>	≥1xMIC
9150	4xMIC	≥1xMIC	≥1xMIC	≥1xMIC <sup>3</sup>	≥1xMIC
509	4xMIC	≥1xMIC	≥2xMIC	≥1xMIC <sup>3</sup>	≥1xMIC
2845	4xMIC	≥1xMIC	≥1xMIC	≥1xMIC <sup>3</sup>	≥1xMIC
896/1	1-4xMIC	≥1xMIC	≥2xMIC	≥1xMIC <sup>3</sup>	≥1xMIC
CP 120	2-4xMIC	≥1xMIC	≥2xMIC	≥1xMIC <sup>3</sup>	≥1xMIC
CP 117	4xMIC	≥1xMIC	≥2xMIC	≥1xMIC <sup>3</sup>	≥1xMIC
<i>C. orthopsilosis</i>					
ATCC 96139	4-8xMIC	≥2xMIC	≥4xMIC	≥1xMIC	≥1xMIC
CP 85	2-4xMIC	≥2xMIC	≥4xMIC	≥0,5xMIC	≥2xMIC
CP 25	8-16xMIC	≥1xMIC	≥1xMIC	≥1xMIC	≥1xMIC
CP 125	1-4xMIC	≥2xMIC	≥8xMIC	≥2xMIC	≥4xMIC
<i>C. metapsilosis</i>					
ATCC 96144	4-8xMIC	≥1xMIC	≥2xMIC	≥1xMIC	≥1xMIC
CP 5	2-4xMIC	≥1xMIC	≥4xMIC	≥1xMIC	≥1xMIC
CP 92	1-4xMIC	≥2xMIC	≥8xMIC	≥1xMIC	≥4xMIC
CP 86	1-4xMIC	≥1xMIC	≥4xMIC	≥0,5xMIC	≥1xMIC
12821	1-4xMIC	≥1xMIC	≥4xMIC	≥0,5xMIC	≥4xMIC

<sup>1</sup> A kiindulási telepszámhoz képest 99,9 %-os telepszám csökkenés.

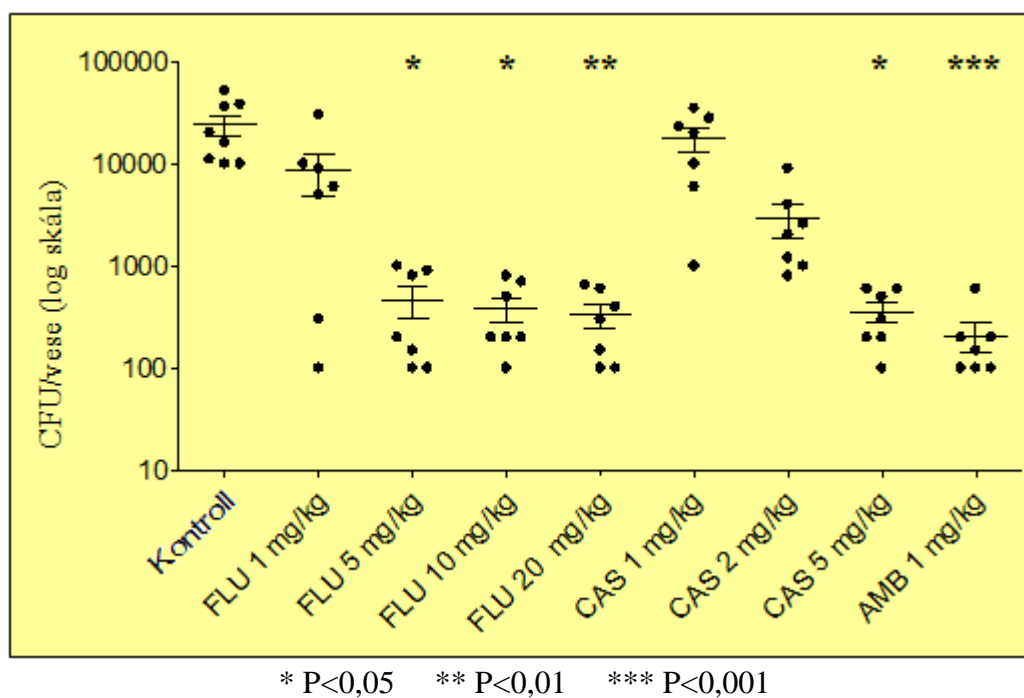
<sup>2</sup> A kiindulási telepszámhoz képest 99,9 %-nál kisebb telepszám csökkenés.

<sup>3</sup> Korábban publikált eredmények [Sóczó és mtsai 2007/a].

## V.2. Az *in vivo* érzékenységi vizsgálatok eredményei

### V.2.1. A *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumokkal végzett vizsgálatok eredményei

15. ábra: A fluconazol (FLU), amphotericin B (AMB), caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. parapsilosis sensu stricto* 9150 törzzsel fertőzött neutropéniás egérmódelben. A vesékből kitenyésztett csíraszám logaritmusát a dózisok függvényében ábrázoltuk [Szilágyi és mtsai. 2012].

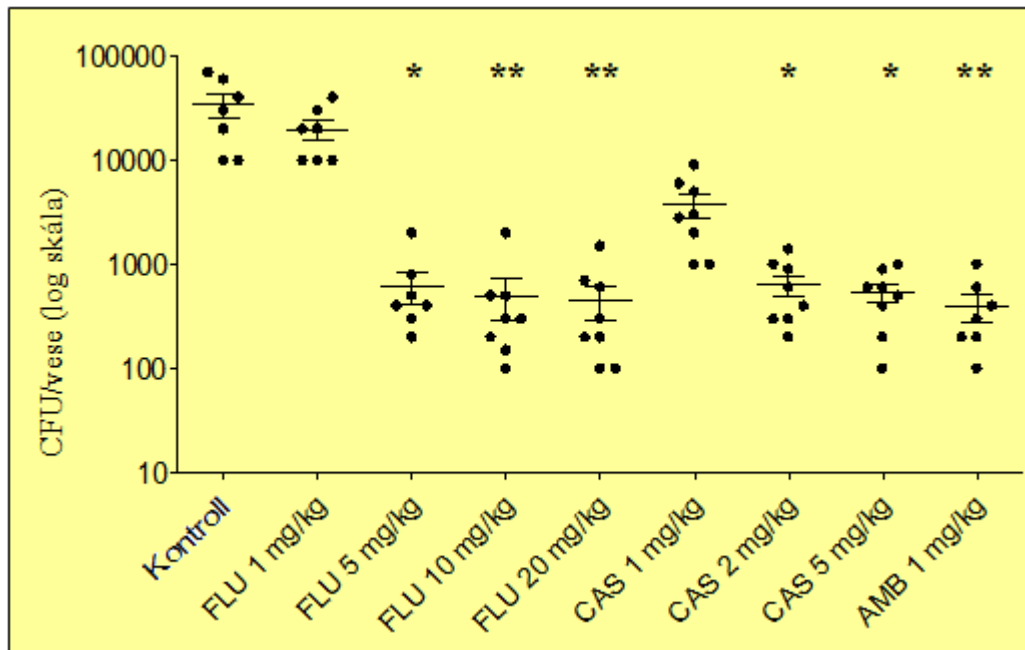


Míg a *C. parapsilosis sensu stricto* 9150 törzzsel fertőzött neutropéniás egérmódelben a napi 1 mg/kg FLU dózis hatástalan volt ( $P>0,05$ ), addig a napi 5 mg/kg, 10 mg/kg ( $P<0,05$ ) és 20 mg/kg ( $P<0,01$ ) FLU kezelés szignifikánsan csökkentette a vesékből kinőtt gombák számát.

A vizsgált CAS dózisok közül kizárólag a legnagyobb, napi 5 mg/kg volt hatásos ( $P<0,05$ ).

A napi 1 mg/kg AMB a vesékből kitenyésztett gombákat szintén szignifikánsan csökkentette a kontroll csoportéhoz képest ( $P<0,001$ ) (15.ábra).

16. ábra: A fluconazol (FLU), amphotericin B (AMB), caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. parapsilosis sensu stricto* 896/1 törzzsel fertőzött neutropéniás egérmódelben. A vesékből kitenyésztett csíraszám logaritmusát a dózisok függvényében ábrázoltuk [Szilágyi és mtsai. 2012].



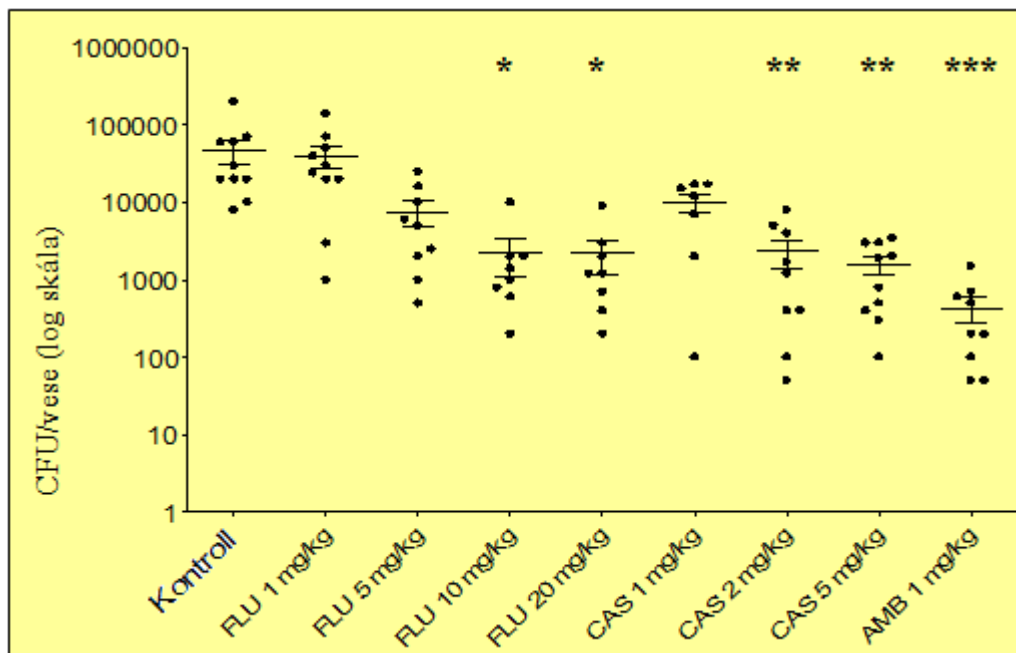
\*  $P < 0,05$     \*\*  $P < 0,01$     \*\*\*  $P < 0,001$

Hasonlóan a 9150-es számú *C. parapsilosis sensu stricto* izolátummal fertőzött egérmódelhez, az 1 mg/kg dózis kivételével, a FLU valamennyi tesztelt dózisa hatásosnak bizonyult (5 mg/kg -  $P < 0,05$ ; 10 mg/kg -  $P < 0,01$ ; 20 mg/kg -  $P < 0,001$ ) a *C. parapsilosis sensu stricto* 896/1 törzs esetén. Az 5 mg/kg napi CAS dózis mellett a 2 mg/kg napi echinocandin is szignifikáns csíraszám redukáló hatást eredményezett ( $P < 0,05$ ).

Az 1 mg/kg AMB szintén szignifikáns ( $P < 0,01$ ) gombaszám csökkentő hatást okozott (16. ábra).

## V.2.2. A *C. orthopsilosis* izolátumokkal végzett vizsgálatok eredményei

17. ábra: A fluconazol (FLU), amphotericin B (AMB), caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. orthopsilosis* CP25 törzsszel fertőzött neutropeniás egérmódelben. A vesékből kitenyésztett csíraszám logaritmusát a dózisok függvényében ábrázoltuk [Szilágyi és mtsai. 2012].



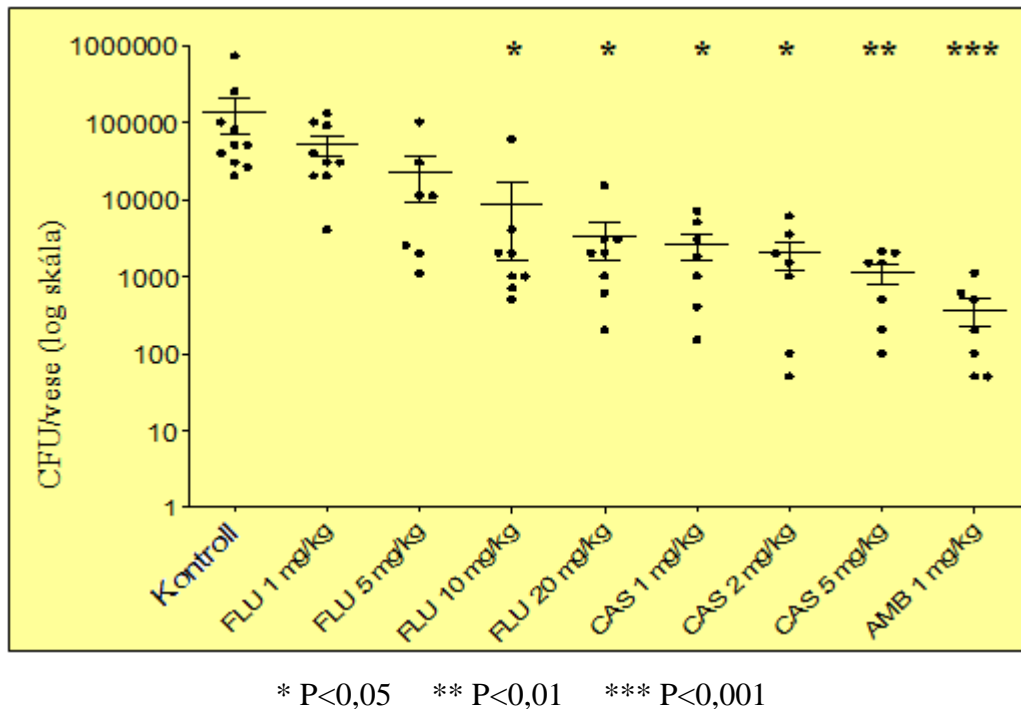
\*  $P < 0,05$     \*\*  $P < 0,01$     \*\*\*  $P < 0,001$

A vesékből kitenyésztett gombaszámot a *C. orthopsilosis* CP25 törzsszel fertőzött neutropeniás egérmódelben a FLU napi 1 mg/kg és 5 mg/kg dózisa nem csökkentették szignifikánsan, ezzel szemben a kontroll csoporthoz képest a magasabb, 10 és 20 mg/kg FLU hatásosnak bizonyult ( $P < 0,05$ ).

A kezeletlen csoporttal összehasonlítva a CAS napi 2 mg/kg és 5 mg/kg dózisa a *C. parapsilosis sensu stricto* 896/1 izolátumhoz hasonlóan effektívek voltak ( $P < 0,01$ ).

Az előző két kísérleti modellel megegyezően az AMB napi 1 mg/kg-os dózisa ebben az esetben is szignifikáns terápiás hatást okozott (17. ábra).

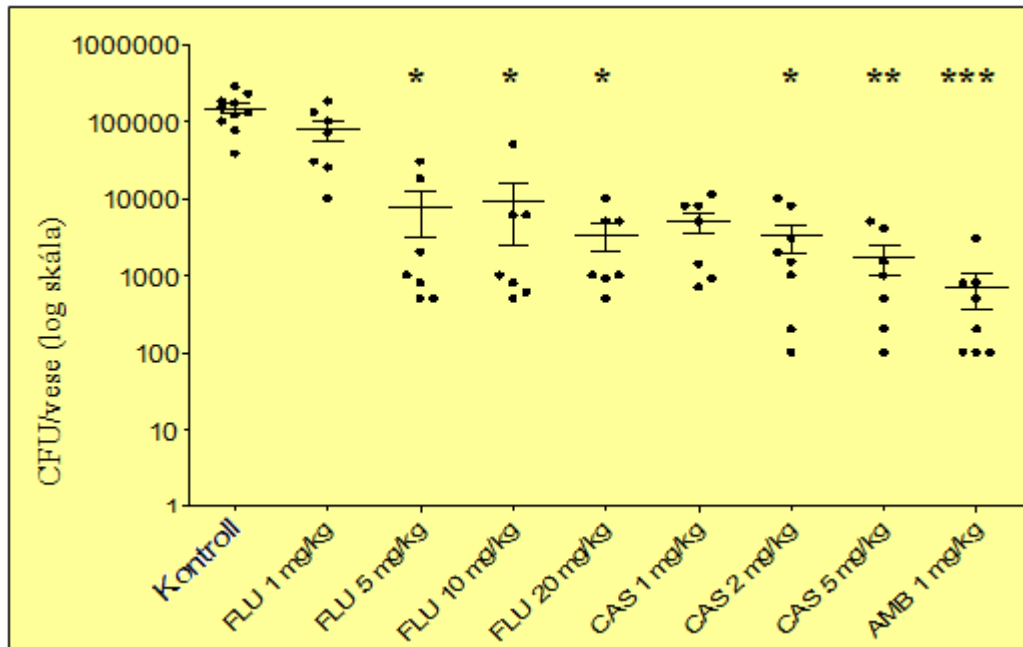
18. ábra: A fluconazol (FLU), amphotericin B (AMB), caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. orthosporiosis* CP85-ös törzssel fertőzött neutropéniás egérmodellben. A vesékből kitenyésztett csíraszám logaritmusát a dózisok függvényében ábrázoltuk [Szilágyi és mtsai. 2012].



A *C. orthosporiosis* CP85 izolátummal beoltott neutropéniás egerek esetében jól látható, hogy míg az 1 mg/kg és az 5 mg/kg napi FLU dózisok hatástalanok voltak ( $P>0,05$ ), addig a magasabb 10 és 20 mg/kg napi FLU dózisok effektívnek bizonyultak ( $P<0,05$ ), amely eredmény megegyezik a *C. orthosporiosis* CP25 izolátum esetében megfigyelttel.

Mindhárom CAS napi adag (1 mg/kg, 2 mg/kg, 5 mg/kg -  $P<0,05$ ) a kontroll egerek veséiből kinőtt csíraszámhoz képest szignifikánsan csökkentette a kitenyésztett gombák számát. Hasonlóan az előző kísérletekhez, a napi 1 mg/kg AMB ebben az esetben is szignifikáns csíraszám csökkentő hatású volt ( $P<0,001$ ) (18. ábra).

19. ábra: A fluconazol (FLU), amphotericin B (AMB), caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. orthosporosis* CP125-ös törzssel fertőzött neutropéniás egérmódelben. A vesékből kitenyésztett csíraszám logaritmusát a dózisok függvényében ábrázoltuk [Szilágyi és mtsai. 2012].



\*  $P < 0,05$     \*\*  $P < 0,01$     \*\*\*  $P < 0,001$

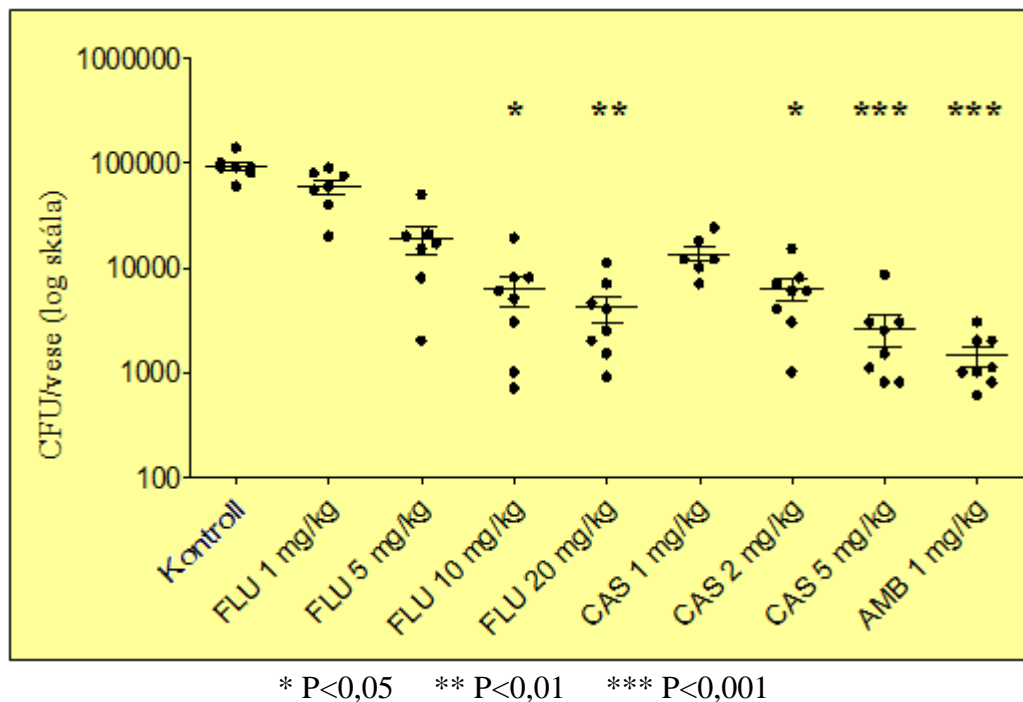
Hasonlóan az előző törzsekhez a napi 1 mg/kg FLU terápia nem, míg a 10 és 20 mg/kg napi dózisok szignifikáns csökkenést okoztak a CP125 *C. orthosporosis* törzssel fertőzött neutropéniás egerek veséiből kitenyésztett csíraszámában a kontroll csoporthoz képest ( $P > 0,05$ ). Az előző két *C. orthosporosis* fajtól (CP25, CP85) eltérően a magasabb 5 mg/kg napi FLU dózis hatásosnak bizonyult ( $P < 0,05$ ).

A CAS napi 2 mg/kg és 5 mg/kg dózisaival ezzel a *C. orthosporosis* izolátummal szemben is effektívek voltak.

Az előző egér modellekkel megegyezően az 1 mg/kg/nap AMB ezzel az izolátummal szemben is szignifikánsan csökkentette a rágcsálók veséiből kinőtt sejtszámot (19. ábra).

### V.2.3. A *C. metapsilosis* izolátumokkal végzett vizsgálatok eredményei

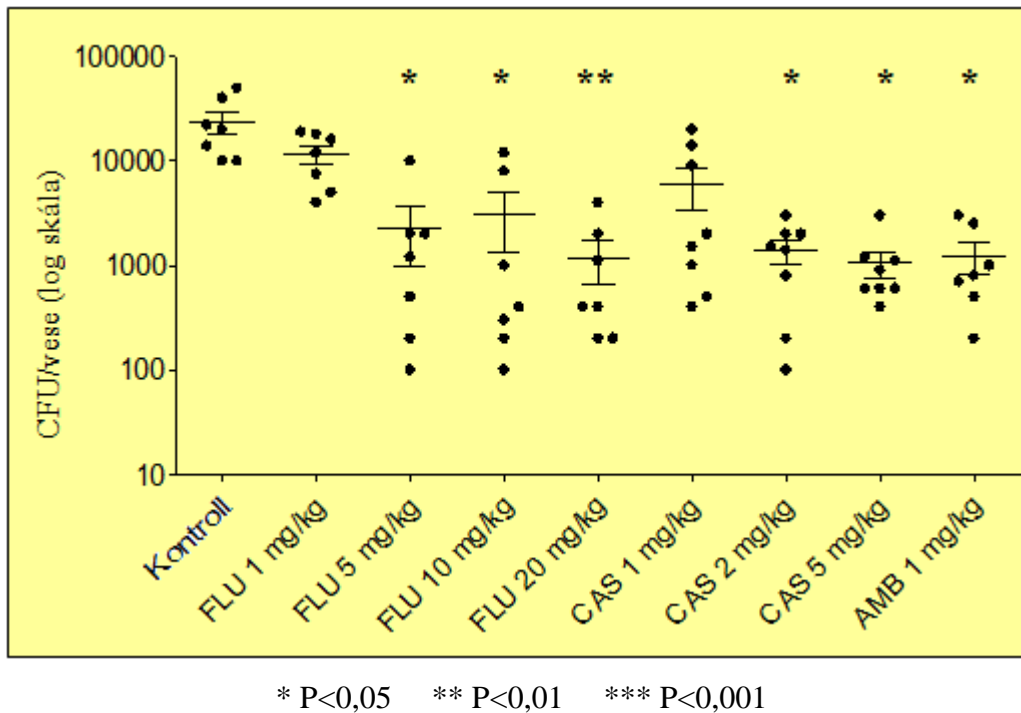
20. ábra: A fluconazol (FLU), amphotericin B (AMB), caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. metapsilosis* CP5-ös törzssel fertőzött neutropéniás egérmódelben. A vesékből kitenyésztett csíraszám logaritmusát a dózisok függvényében ábrázoltuk [Szilágyi és mtsai. 2012].



A *C. metapsilosis* CP5 izolátummal fertőzött neutropéniás egérmódel legjobban a *C. orthopsilosis* CP25-ös számú törzssel beoltott modell eredményeivel egyezik meg; ugyanis mindkét kísérlet esetén a hatástalan, alacsonyabb FLU dózisok (1 és 5 mg/kg/nap) mellett a magasabb FLU adagok (10 és 20 mg/kg) szignifikáns csíraszám csökkentő hatást eredményeztek a kontroll csoporthoz képest ( $P<0,05$ ;  $P<0,01$ ).

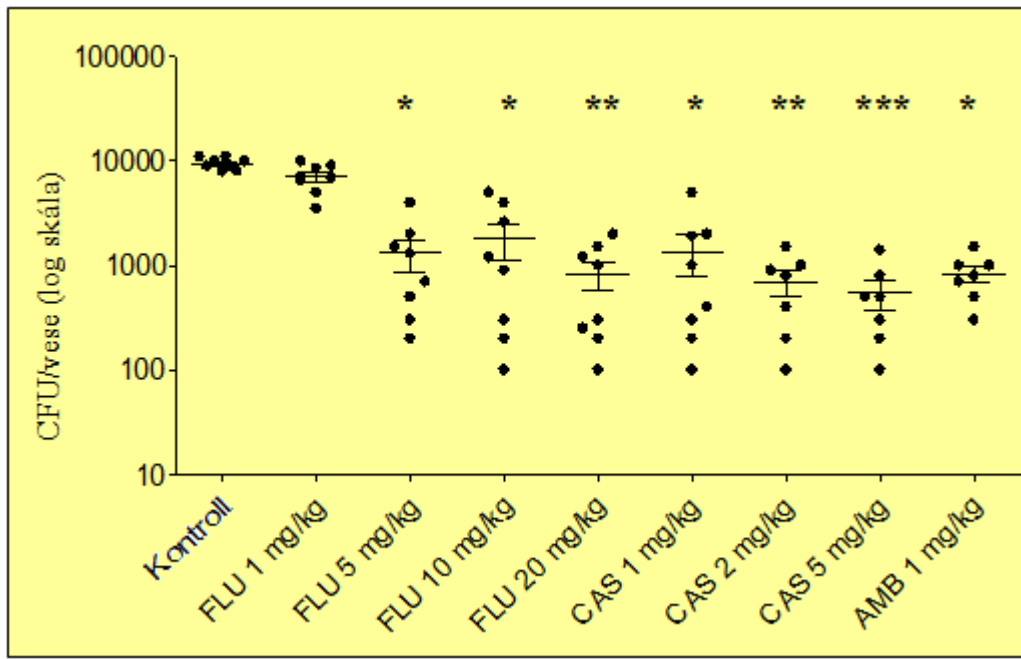
Ebben az esetben a CAS 2 és 5 mg/kg ( $P<0,05$ ;  $P<0,001$ ), valamint az AMB 1 mg/kg napi dózisa ( $P<0,001$ ) szintén hatásosak voltak a kontroll egerek veséiből kinőtt gombasejtek számához képest (20. ábra).

21. ábra: A fluconazol (FLU), amphotericin B (AMB), caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. metapsilosis* CP86 törzssel fertőzött neutropéniás egérmodellben. A vesékből kitenyésztett csíraszám logaritmusát a dózisok függvényében ábrázoltuk [Szilágyi és mtsai. 2012].



A *C. metapsilosis* CP86-os számú izolátum esetében a FLU 5, 10 és 20 mg/kg (P<0,05; P<0,01), a CAS 2 és 5 mg/kg (P<0,05), valamint az AMB 1 mg/kg (P<0,05) napi dózisaik hatásosnak bizonyultak a kezeletlen kontroll csoporthoz képest (21. ábra).

22. ábra: A fluconazol (FLU), amphotericin B (AMB), caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. metapsilosis* CP92-es törzzsel fertőzött neutropéniás egérmodellben. A vesékből kitenyésztett csíraszám logaritmusát a dózisok függvényében ábrázoltuk [Szilágyi és mtsai. 2012].



\* P<0,05    \*\* P<0,01    \*\*\* P<0,001

Az ábráról jól látható, hogy a *C. metapsilosis* CP92 fajjal fertőzött egérmodellben a kontroll csoporthoz képest az 1 mg/kg napi FLU dózis kivételével az összes vizsgált antifungális szer szignifikánsan csökkentette az egerek veséiből kinőtt sejtszámot (22. ábra).

Az *in vivo* eredményeket a 10. táblázatban foglaltam össze.

10. táblázat. Az antifungális szerek *in vivo* hatékonyságának összesítése.

[Szilágyi és mtsai. 2012].

Klinikai izolat	FLU mg/kg/nap				CAS mg/kg/nap			AMB mg/kg/nap
	1	5	10	20	1	2	5	1
<i>C. parapsilosis sensu stricto</i> 9150	P>0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,01	P>0,05	P>0,05	P<0,05	P<0,001
<i>C. parapsilosis sensu stricto</i> 896/1	P>0,05	P<0,05	P<0,01	P<0,01	P>0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,01
<i>C. orthopsilosis</i> CP25	P>0,05	P>0,05	P<0,05	P<0,05	P>0,05	P<0,01	P<0,01	P<0,001
<i>C. orthopsilosis</i> CP85	P>0,05	P>0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,01	P<0,001
<i>C. orthopsilosis</i> CP125	P>0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P>0,05	P<0,05	P<0,01	P<0,001
<i>C. metapsilosis</i> CP5	P>0,05	P>0,05	P<0,05	P<0,01	P>0,05	P<0,05	P<0,001	P<0,001
<i>C. metapsilosis</i> CP86	P>0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,01	P>0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05
<i>C. metapsilosis</i> CP92	P>0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,01	P<0,05	P<0,01	P<0,001	P<0,05

Szignifikáns eredmény: P<0,05

Nem szignifikáns eredmény: P>0,05

### **V.3. A kísérleti munkában részt vevő társszerzők munkájának ismertetése**

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

**Szabó Z, Szilágyi J, Tavanti A, Kardos G, Rozgonyi F, Bayegan S, Majoros L. 2009. *In vitro* efficacy of 5 antifungal agents against *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* as determined by time-kill methodology. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 64(3):283-8.**

*A klinikai minták beszerzése és azonosítása:* Ariana Tavanti, Szabó Zsuzsanna, Szilágyi Judit.

*Az izolátumok MIC értékének meghatározása:* Szabó Zsuzsanna, Szilágyi Judit, Sedigh Bayegan.

*Idő-ölés kísérletek elvégzése 5 antifungális szer esetén:* Szabó Zsuzsanna, Szilágyi Judit, Sedigh Bayegan.

*A kísérletes munka tervezése, eredmények kiértékelése:* Szabó Zsuzsanna, Szilágyi Judit, dr. Kardos Gábor, dr. Majoros László.

*Kézirat revízió:* dr. Majoros László

**Szilágyi J, Földi R, Gesztelyi R, Bayegan S, Kardos G, Juhász B, Majoros L. 2012. 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):159-64.**

*A klinikai minták beszerzése és azonosítása:* Ariana Tavanti, Szilágyi Judit, Földi Richard, Sedigh Bayegan

*Az izolátumok MIC értékének meghatározása:* Szilágyi Judit, Földi Richard, Sedigh Bayegan

*Az in vivo kísérletek elvégzése:* Szilágyi Judit, Földi Richard, Sedigh Bayegan, dr. Majoros László

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

*Kézirat revízió:* dr. Majoros László

## VI. Megbeszélés

Az invazív gombafertőzések ellen használható antifungális szerek száma 30 %-kal nőtt az új évezred óta [Dodds Ashley és mtsai. 2006]. Ennek ellenére a betegek mortalitása sajnos még mindig elfogadhatatlanul nagy, elérheti akár a 42 %-ot is [Chapman és mtsai. 2008].

Egy ideális gomba ellenes szer széles spektrumú, a vele szemben rezisztens izolátumok száma alacsony, *per os* és i.v.-san is adagolható, kevés mellékhatás és gyógyszer-gyógyszer interakció jellemzi [Chapman és mtsai. 2008]. Nem nehéz belátni, hogy mindez nehezen valósítható meg egyszerre.

A kezelési stratégiák optimalizálása céljából az új antifungális szerek farmakológiai tulajdonságainak ismerete, hatásainak megértése és maximális kihasználása rendkívül fontos, ezért egy antifungális szer klinikai gyakorlatba való bevezetését laboratóriumi *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok előzik meg, amelyekkel az adott szer kórokozók elleni hatása többé-kevésbé megjósolható.

A neutrofil granulociták fontos szerepet töltenek be a gombafertőzésekkel szembeni védelemben, valamint a szöveti invázió megakadályozásában [Nucci és mtsai. 2002, Uzun és mtsai. 2001]. Így nem meglepő, hogy a disszeminált candidiasis kialakulásának fő rizikófaktora a neutropénia, amely áttöréses fertőzések, recidiva és krónikus disszemináció kialakulása esetén is döntő szerepet játszik [Anaissie és mtsai. 1998, Clancy és mtsai. 2000, Fradin és mtsai. 2005, Fulurija és mtsai. 1996, Hope és mtsai. 2002, Nucci és mtsai. 2002, Sallah és mtsai. 2001, Uzun és mtsai. 2001, Walsh és mtsai. 1990].

A 200 mg/kg ciklofoszfamid neutropéniát és monocitopéniát okoz, továbbá hatására jelentősen csökken a lép mérete, a B limfociták, T-helper és T-szupresszor sejtek mennyisége; a fehérvérsejtek száma az immunszuppresszió után négy nappal később kezd helyreállni [Anaissie és mtsai. 1993, Majithiya és mtsai. 2009].

Az immunrendszer szerv-specifikusan reagál a disszeminált candidiasis kialakulására, az egyes szervek *Candida* fertőzéssel szembeni ellenállása eltérő [Lionakis és mtsai. 2011]. Az invazív *Candida* fertőzések boncolási eredményei szerint a leggyakrabban érintett szerv a vese, ezért nem véletlenül vizsgálják ezt a legtöbbször a candidiasis-os farmakodinamikai modellekben [Hope és mtsai. 2009]. Fertőzés esetén a lépben és a májban jelentősen több neutrofil gyűlik össze, mint a vesékben, így a kritikus, első 24 órában a vesék védtelenek,

bennük a fertőzés előrehaladott állapotba, míg a lépben és a májban kontroll alá kerülhet [Lionakis és mtsai. 2011].

A korábban *C. parapsilosis sensu lato* néven ismert fajt nemrégiben három részre csoportosították: *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* [Tavanti és mtsai. 2005]. A *C. orthopsilosis* incidenciája 2004 óta 2,3 %-ról 9 %-ra, a *C. metapsilosis* gyakorisága pedig 0,9 %-ról 6,9 %-ra nőtt az alapos kutatások eredményeképpen [Cantón és mtsai. 2011, Lockhart és mtsai. 2008]. Az epidemiológiai felmérések alapján a „*psilosis*” csoport leggyakoribb emberi fertőzést okozója a *C. parapsilosis sensu stricto* faj [Cantón és mtsai. 2011].

A faj virulenciáját összehasonlítva a *C. albicans* fajéval elmondható, hogy a *C. parapsilosis sensu stricto* kisebb virulenciájú [Arendrup és mtsai. 2002]. Arendrup és munkatársai [2002] állatkísérletek során figyelték meg, hogy a *C. albicans*  $10^7$  CFU/egér fertőző dózisa az egerek teljes, azaz 100 %-os pusztulását, míg a *C. parapsilosis* faj ugyanezen dózisa az egerek 100 %-os túlélését eredményezte nem-neutropéniás modellükben. Annak ellenére, hogy a *C. parapsilosis sensu stricto* fajhoz képest a *C. albicans* nagyobb virulenciájú, ez utóbbi ellen a CAS sokkal hatásosabb volt számos állatkísérletben [Flattery és mtsai. 2011, Migoya és mtsai. 2011, Stone és mtsai. 2002]. A virulencia a „*psilosis*” csoporton belül is eltérő, a legvirulensebb a *C. parapsilosis sensu stricto*, a legkevésbé virulens a *C. metapsilosis* faj [Orsi és mtsai. 2010].

A CLSI nemrég a terápiák eredményességének növelése céljából új, faj-specifikus határértékeket (breakpoint) határozott meg az öt leggyakoribb *Candida*, köztük a *C. parapsilosis sensu stricto* fajra is [Pfaller és mtsai. 2010/c, Pfaller és mtsai. 2011/d]. Ezek az új értékek a régiekhez képest három (FLU), illetve négy (echinocandin) hígítási fokkal is kisebbek lehetnek. Segítségükkel a „vad típusú” izolátumok megkülönböztethetőek azoktól, amelyekben a klinikai kimenetelt hátrányosan befolyásoló, de a MIC értékben nem feltétlenül megnyilvánuló mutációk vagy szerzett rezisztenciák vannak jelen [Pfaller és mtsai. 2010/c Pfaller és mtsai. 2011/d].

A korábbi *in vitro* tesztek eredményei szerint a „*psilosis*” csoport tagjainak nem egyforma az antifungális szerekkel szembeni érzékenysége; ugyanis a *C. parapsilosis sensu stricto* AMB, echinocandin és FLU iránti érzékenysége kisebb, mint a *C. metapsilosis* vagy *C. orthopsilosis* fajoké [Cantón és mtsai. 2011, Gomez-Lopez és mtsai. 2008, Lockhart és mtsai. 2008, van

Asbeck és mtsai. 2008]. Cantón és munkatársai [2011] az új faj-specifikus határértékeket alkalmazva a *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumok 0,3 %-ánál tapasztaltak AMB, POS, ITR, CAS rezisztenciát, valamint 1,9 %-ánál ANI, és 2,5 %-ánál MICA rezisztenciát. Az új, faj-specifikus határértékek alapján a *C. parapsilosis sensu stricto* FLU rezisztencia gyakorisága 0 %-ról 4,8 %-ra, a *C. orthopsilosis* fajé 0,3 %-ra nőtt [Cantón és mtsai. 2011]. Ez alapján a *C. parapsilosis sensu stricto* érzékenységi határértékei nem biztos, hogy a *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* fajok esetén is sikeresen alkalmazhatóak.

A Cantón és munkacsoportja [2011] által vizsgált utóbbi két faj izolátumai a CLSI határértékek alapján érzékenyek voltak kilenc antifungális szerrel szemben (CAS, MICA, ANI, FLU, VOR, ITR, POS, 5-FC, AMB). Ezzel szemben egy másik vizsgálatban a *C. orthopsilosis* izolátumok 30,4 %-át, a *C. metapsilosis* törzsek 10 %-át  $>1 \mu\text{g/mL}$  AMB koncentráció gátolta, sőt egy FLU rezisztens *C. orthopsilosis* (MIC:  $64 \mu\text{g/mL}$ ) és *C. metapsilosis* (MIC:  $16 \mu\text{g/mL}$ ) izolátumot is detektáltak [Borghini és mtsai. 2011, Diekema és mtsai. 2009].

Az *in vitro* vizsgálatainkban tesztelt *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* klinikai izolátumok AMB MIC értékei az előzőekhez hasonlóan alacsonyabbak voltak, mint a *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumoké. Lockhart megfigyeléseivel [2008] ellentétben, az alkalmazott módszertől függetlenül egyik vizsgált izolátum AMB MIC értéke sem haladta meg a  $2 \mu\text{g/mL}$  értéket. Az AMB *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* esetében  $1-8\times\text{MIC}$  koncentráción megfigyelt lassú (24 vagy 48 órás) fungicid hatásáról Cantón is beszámolt [Cantón és mtsai. 2011]. Az *in vitro* kísérleteinkben a „*psilosis*” csoport ellen 24 és 48 óra elteltével az  $1-4 \mu\text{g/mL}$  AMB koncentráció ( $0,5-16\times\text{MIC}$ ) fungicid hatást eredményezett.

Az AMB terápia hatékonyságát leginkább a  $C_{\text{max}}/\text{MIC}$  (szérum maximális AMB koncentrációja/MIC) farmakodinamikai paraméter jelzi előre [Hope és mtsai. 2009, Louie és mtsai. 1999]. *In vivo* kísérleteinkben  $1 \text{ mg/kg}$  AMB mind a vizsgált nyolc izolátummal szemben hatásos volt és annak ellenére, hogy az alkalmazott  $1 \text{ mg/kg}$  AMB dózis valamivel magasabb  $C_{\text{max}}$  értéket eredményez egerekben, mint emberekben, az antifungális szer nagymértékű fehérjekötődését figyelembe véve a szabad gyógyszerkoncentrációk összehasonlíthatóak [Hope és mtsai. 2009, Louie és mtsai. 1999]. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az AMB kiváló aktivitást mutat mindhárom fajjal szemben. Megjegyzendő, hogy a mikrodilúciós módszerrel végzett vizsgálatainkban voltak olyan izolátumaink melyeknek, a többszöri mérések során  $>1 \mu\text{g/mL}$ -es MIC értékei voltak, de E-teszttel  $\leq 1$

$\mu\text{g/mL}$  MIC értéket kaptunk. Az irodalmi adatokkal megegyezve, a terápiás kimenetelt az E-teszttel mért MIC értékek jobban jelezhetik [Clancy és mtsai. 1999, Park és mtsai. 2006, Pfaller és mtsai. 2004/c].

*In vitro* kísérleteinkben a 48 órás MIC leolvasási időponttal ellentétben, a 24 órás MIC leolvasási időpontot alkalmazva a FLU MIC értékek 1-4 hígítási fokkal alacsonyabbak voltak mindhárom faj esetében (a 24 órás FLU MIC meghatározást csak az *in vivo* kísérletek esetén végeztük el, hiszen az első kézirat megírásakor még a 48 órás MIC leolvasás volt az elfogadott). Annak ellenére, hogy a *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* FLU érzékenységi határértékeit még nem definiálták figyelemreméltó, hogy MIC értékeik megegyeztek, illetve alacsonyabbak voltak, mint a *C. parapsilosis sensu stricto* faj esetében javasolt új határértékek (2 mg/L) [Pfaller és mtsai. 2010/c].

A *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* fajok esetében 48 órára kapott FLU MIC értékek a régi érzékenységi határérték (8  $\mu\text{g/mL}$ ) közelébe esnek. A régebbi, 8  $\mu\text{g/mL}$  koncentrációjú FLU érzékenységi határértéket, a CLSI az új faj-specifikus érzékenység megállapításakor két hígítási fokkal, 2  $\mu\text{g/mL}$  koncentrációra csökkentette; így a tesztelt *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* izolátumok a 24 órás MIC értékek alapján még érzékenyek tekinthetők, viszont a 48 órás MIC eredmények szerint nem lennének érzékenyek [NCCLS M27-A2 2002, Pfaller és mtsai. 2011/c].

Lockhart [2008], valamint van Asbeck és munkatársai [2008] 0,25-64  $\mu\text{g/mL}$  közötti FLU MIC értékeket figyeltek meg *C. parapsilosis sensu stricto* és *C. orthopsilosis* fajok esetében, azonban 16  $\mu\text{g/mL}$  koncentrációnál nagyobb FLU MIC értéket nem írtak le *C. metapsilosis* izolátumokat vizsgálva. Ennek ellenére többen is megállapították, hogy a „*psilosis*” csoportból a *C. metapsilosis* rendelkezik a legnagyobb FLU MIC értékkel [Gomez- Lopez és mtsai. 2008, van Asbeck és mtsai. 2008].

Az idő-ölés vizsgálataink és korábbi megfigyelések alapján a *C. orthopsilosis*, illetve *C. metapsilosis* fertőzések kezelése nagyobb dózisu FLU-t igényel (4-8  $\mu\text{g/mL}$ ;  $\geq 2 \times \text{MIC}$ ) [Pfaller és mtsai. 2006/a]. Ezzel szemben a *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumokat MIC közeli FLU koncentrációk (0,5-2  $\mu\text{g/mL}$ ;  $\geq 1 \times \text{MIC}$ ) is gátolták *in vitro*.

A FLU kezelés hatékonyságát legjobban előrejelző farmakodinamikai paraméter az AUC/MIC (koncentráció görbe alatti terület/MIC) [Andes és mtsai. 2004, Hope és mtsai. 2009, Louie és mtsai. 1999]. Az *in vivo* kísérletekben mind a nyolc vizsgált izolátum

növekedését már 10 és 20 mg/kg FLU napi dózis is gátolta. Mivel a napi 25 mg/kg FLU egereknek és a napi 100 mg/kg FLU embereknek adva lényegében ugyanazt a 24 órás AUC értéket eredményezi (90 mg·h/l), a kapott eredményeink alapján a FLU még minimális terápiás dózisokban alkalmazva is rendkívül hatásos *in vivo* a „*psilosis*” csoport ellen [Louie és mtsai. 1999]. Ennek magyarázata lehet az is, hogy *in vivo* a FLU koncentráció-független, hosszú ideig tartó posztantifungális aktivitást mutat azután is, hogy a gyógyszerkoncentráció szintje a MIC érték alá csökken [Andes és mtsai. 1999]. Az eredményeink alapján a 24 óra múlva leolvasott FLU MIC értékek jó korrelációt mutattak az *in vivo* hatással, különböző FLU dózisokkal kezelt egérmódelünkben.

Az alapján, hogy a három faj növekedésgátlásához szükséges VOR MIC koncentrációk a szérumban elérhető VOR koncentráció alatt voltak, a gyógyszer biztonságos választásnak mondható nem neutropéniás betegek kezelése esetén. Az *in vitro* idő-ölés kísérletek során a VOR fungisztatikusnak bizonyult (<99,9 % csíraszám csökkenés), amely a *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumokat alacsonyabb ( $\geq 1 \times \text{MIC}$ ; 0,015-0,12  $\mu\text{g/mL}$ ), a *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* törzseket viszont magasabb ( $4-8 \times \text{MIC}$ ; 0,25-0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) koncentrációkon gátolta. Ezek az *in vitro* idő-ölés eredmények a MIC értékekkel szemben viszont a VOR gyenge *in vivo* hatására utalhatnak, amelyről már mások is beszámoltak [Roffey és mtsai. 2003]. A szer gyengébb *in vivo* aktivitásának oka, az egerek szervezetében lejátszódó gyors metabolizmusa, amely a vérben mérhető szabad VOR szintet gyorsan csökkenti [Roffey és mtsai. 2003]. Ezért is javasolják VOR terápia alatt grapefruit lé *per os* adását, ugyanis megfigyelések szerint ez gátolja a szer gyors metabolizmusát [Roffey és mtsai. 2003]. Mindazonáltal, ha olyan klinikai helyzet áll fenn, hogy a beteg VOR kezelésben részesül, akkor 5-6 nap terápia után érdemes ennek a széles körben alkalmazott antifungális szernek a vérbeli koncentrációját megmérni [Andes és mtsai. 2003].

A POS *in vitro* viszonylag kisebb koncentrációkban szintén fungisztatikus hatással bírt a *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* fajok ellen, több izolátum esetén nagyobb, mint  $1 \log_{10}$  csíraszám csökkenést okozott. Ehhez hasonló eredményeket figyeltek meg a *C. parapsilosis sensu stricto* esetén is, ahol a fungisztatikus hatás már alacsony, MIC értékekhez közeli POS koncentrációkon bekövetkezett és a magasabb,  $32-64 \times \text{MIC}$  koncentrációk ellenére egyetlen esetben sem alakult ki a szer fungicid hatása [Sóczó és mtsai. 2007/b-c]. A POS hatékonyságát *in vivo* is meg kellene erősíteni, ennek azonban az szab határt, hogy a szer jelenleg intravénásan nem adható [Pappas és mtsai. 2009]. Ráadásul a felszívódás fokozása csak zsírdús étkezéssel valósítható meg, nehézzé téve a szer hatásának megítélését.

Az 5-FC MIC értékeket mindegyik tesztelt törzs esetében  $\leq 0,12$   $\mu\text{g/mL}$  koncentráción figyeltük meg. Az 5-FC is kiváló fungisztatikus hatást eredményezett alacsony koncentráción ( $\leq 0,12$   $\mu\text{g/mL}$ ) a „*psilosis*” csoport mindegyik tagjával szemben, egyetlen alkalmazott koncentrációban sem volt fungicid. Más antifungális szerrel kombinálva eredményes lehet a „*psilosis*” csoportba tartozó fajok által okozott fertőzések ellen.

A CAS *in vitro* és *in vivo* is koncentrációfüggő aktivitással jellemezhető [Denning és mtsai. 2003, Deresinski és mtsai. 2011]. Az *in vivo* aktivitásukat jelentősen meghatározza az infekció helyén kialakult gyógyszerkoncentrációjuk nagysága. Az echinocandinok a véráramból a szövetekbe lépnek, ahonnan később ismét visszajutnak a vérbe [Denning és mtsai. 2003, Eschenauer és mtsai. 2007]. Ez a farmakokinetikai tulajdonságuk lehetővé teszi a napi egyszeri adagolásukat [Denning és mtsai. 2003, Eschenauer és mtsai. 2007].

A CAS általunk *in vitro* mért MIC értékei a két újabban elkülönített *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* faj esetében alacsonyabbak voltak (0,12-0,5  $\mu\text{g/mL}$ ), mint a *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumoké (0,5-2  $\mu\text{g/mL}$ ). Tavanti és Lockhart [2007, 2008] kutatócsoportja a *C. orthopsilosis* esetében hasonló MIC értékeket (0,18  $\mu\text{g/mL}$ ) kapott.

Az echinocandinok esetében, a *C. parapsilosis sensu stricto* fajra a CLSI megtartotta a korábbi, 2  $\mu\text{g/mL}$  érzékenységi határértéket [Pfaller és mtsai. 2011/d]. Mindemellett az echinocandinok nem tekinthetők első vonalbeli szerekeknek a *C. parapsilosis* által okozott fertőzések kezelése esetén [Pappas és mtsai. 2009]. Ezt alátámasztja, hogy echinocandin terápia során kialakulhat *C. parapsilosis* okozta áttörésszerű fertőzés is [Kabbara és mtsai. 2008]. A *C. parapsilosis sensu lato* echinocandinokkal szembeni csökkent érzékenységének bizonyítéka az is, hogy FLU és CAS kezelés után Moudgal és munkatársai [2005] FLU, VOR, CAS és MICA rezisztenciát figyeltek meg endocarditises betegek esetén. Vazquez és munkatársai [2006] is multi-echinocandin és multi-azol rezisztenciájú *C. parapsilosis sensu lato* izolátumokat detektáltak kórházuk égési osztályán fekvő betegek mintáiból. Forrest és munkatársai [2008] pedig szignifikáns korrelációt mutattak ki a megnövekedett CAS alkalmazás és a *C. parapsilosis sensu stricto* okozta candidaemia nagyobb gyakorisága között, amit kizárólag faj-specifikus jelenségnek könyveltek el. Ezzel ellentmondásosan már többen is beszámoltak *C. parapsilosis* fertőzések sikeres echinocandin terápiájáról [Betts és mtsai. 2009, Pappas és mtsai. 2009].

A „*psilosis*” csoportba tartozó fajok elsődlegesen csökkent echinocandin érzékenységét azzal magyarázzák, hogy a glükán-szintetáz enzimük 660. prolin aminosavja helyén alanin található az *Fks1* „forró területének” 2. régiójában [Perlin és mtsai. 2007, Walker és mtsai. 2010]. A *C. parapsilosis sensu lato* ezen csökkent echinocandin érzékenységét Barchiesi és munkatársai [2007] állatkísérletben is bebizonyították.

A „*psilosis*” csoport *in vitro* idő-ölés vizsgálatai során megfigyelték, hogy a *C. orthopsilosis* a *C. parapsilosis sensu stricto* fajokhoz hasonlóan viselkedett, azaz fungisztatikus vagy paradox növekedést mutattak CAS hatására, bár az egyik *C. orthopsilosis* izolátumot 2 µg/mL (16×MIC) CAS elpusztította [Cantón és mtsai. 2010, Varga és mtsai. 2008]. (A paradox növekedés az antifungális szer csökkent *in vitro* aktivitását jelenti a szer magas, de nem közvetlen MIC feletti koncentrációján [Wiederhold és mtsai. 2007]). A 48 órás inkubálási időt követően csak egy *C. parapsilosis sensu stricto* és *C. orthopsilosis* faj esetében vált fungiciddé a gyógyszer [Varga és mtsai. 2008]. Megfigyelték azt is, hogy a *C. metapsilosis* volt a legérzékenyebb faj ezzel a szerrel szemben; míg néhány *C. orthopsilosis* izolátumot magasabb, 16 µg/mL CAS koncentráció több mint 24 óra után pusztított csak el, addig a *C. metapsilosis* faj esetében ehhez a hatáshoz 4 µg/mL mennyiség rövidebb idő alatt is elegendő volt [Cantón és mtsai. 2010, Varga és mtsai. 2008].

A CAS terápia hatékonysága a FLU-hoz hasonlóan, kapcsolatban áll az AUC/MIC értékkel [Hope és mtsai. 2009, Louie és mtsai. 2005]. Ennek valószínűleg két oka is van. Az egyik a CAS hosszú vesében való perzisztálása, ezen kívül pedig a szer szintén hosszú, koncentrációfüggő posztantifungális hatása [Louie és mtsai. 2005]. Korábbi munkákban az egerek 1, 2 és 4 mg/kg CAS-nal való kezelése 59, 118 és 164 mg·h/l átlagos AUC értékeket eredményezett, amelyek hasonlóak az emberek esetén alkalmazott 35, 50 és 70 mg/kg CAS dózisok által produkált 55, 100 és 114 mg·h/l átlagos AUC értékekhez [Flattery és mtsai. 2011, Földi és mtsai. 2012, Migoya és mtsai. 2011, Stone és mtsai. 2002].

Az *in vivo* kísérleti modelleinkben a CAS hatásosabbnak bizonyult a *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* izolátumok ellen, mint a *C. parapsilosis sensu stricto* ellen, amely megfigyelés az előzőek alapján inkább a fajok kisebb virulenciájával, mint az echinocandinok jó terápiás hatásával magyarázható [Andes és mtsai. 2010, Kuse és mtsai. 2007, Mora-Durate és mtsai. 2002, Orsi és mtsai. 2010].

Munkánkban, a két újabban elkülönített fajjal szemben a CAS már 2 mg/kg napi adagban eredményes volt, ennek 50 mg/nap a megfelelő humán dózisa, amely 8,74 µg/mL csúcskoncentrációt okoz [Flattery és mtsai. 2011, Migoya és mtsai. 2011, Stone és mtsai. 2002].

Ezzel szemben a vizsgált *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumok esetén csak a magasabb 5 mg/kg napi CAS kezelés tudta csökkenteni a veséből kinőtt sejtek számát, amely megfigyelés megerősíti azt a tényt, hogy a CAS-t első vonalbeli szerként nem érdemes alkalmazni ezen faj által okozott fertőzésekben [Barchiesi és mtsai. 2006, Carrillo-Munoz és mtsai. 2008, Migoya és mtsai. 2011, Pappas és mtsai. 2009, Stone és mtsai. 2002, Swoboda és mtsai. 2009]. Az egerek 5 mg/kg/nap dózisának 70 mg/nap a megfelelő emberi dózisa [Flattery és mtsai. 2011, Migoya és mtsai. 2011, Stone és mtsai. 2002]. Ennek ellenére, mivel az általunk vizsgált modellben a magas CAS dózis hatásosnak tűnt a *C. parapsilosis sensu stricto* ellen is, a gyógyszer, ezen faj által okozott fertőzésekben való sikertelen empirikus használatától nem feltétlenül kell tartani [Betts és mtsai. 2009]. Ezt *in vitro* adatok is megerősítik, ugyanis a *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* CAS MIC értékei igen közel állnak a teljesen érzékeny *Candida* fajokra legújabban javasolt érzékenységi határértékekhez (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*: ≤0,25 µg/mL; *C. glabrata*: 0,12 µg/mL) [Pfaller és mtsai. 2011/d].

Munkánk során először az idő-ölés görbék felvételét alkalmaztuk az AMB, FLU, VOR, POS és 5-FC esetén, a „*psilosis*” csoport tagjai ellen. *In vitro* eredményeink azt mutatják, hogy a klinikailag elérhető gyógyszerkoncentrációkon az AMB fungicid, míg a triazolok és az 5-FC fungisztatikus hatásúak a csoport mindhárom tagja ellen. *In vivo* vizsgálataink során három, jól kiszámítható farmakokinetikával rendelkező antifungális szer, az AMB, a FLU és a CAS hatékonyságát vizsgáltuk átmenetileg neutropéniássá tett egerekben. Eredményeink azt mutatják, hogy mindhárom antifungális szer kitűnő *in vivo* hatékonysággal rendelkezik a „*psilosis*” csoport mindhárom tagja ellen. Mivel a „*psilosis*” csoport tagjai főleg nem-neutropéniás betegekben okozhatnak invazív fertőzést, ezért a FLU lehetne az elsőként választandó antifungális szer, klinikailag stabil candidemiás betegek esetén, ha a kórokozó a „*psilosis*” csoportba tartozik. Ha a beteg az empirikus terápia során CAS-t (illetve valamelyik másik echinocandint) kapott, akkor a páciens állapotának javulása esetén maradhatna az echinocandin terápia. Szükségesnek tűnik azonban, hogy a beteg a szokásosnál nagyobb napi dózisú echinocandin kezelésben részesüljön (a szokásos napi dózis akár kétször- illetve háromszorosa is alkalmazható a súlyosabb mellékhatások jelentkezése nélkül) [Betts és mtsai. 2009]. A klinikailag instabil betegek esetén egyértelműen az AMB ajánlható [Pappas és

mtsai. 2009]. Eredményeink jelentőségét az adja, hogy a *C. parapsilosis sensu stricto*, a *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* fajok egymástól jelenleg csak molekuláris biológiai módszerekkel különíthetők el [Gácsér és mtsai. 2007, Lin és mtsai. 1995, Tavanti és mtsai. 2005, Trofa és mtsai 2008]. A fent említett terápiás megközelítés pedig még abban az esetben is alkalmazható, ha a rutin diagnosztikában jelenleg nem megoldott a 3 faj egymástól való elkülönítése. Elgondolásunk helyességét további preklinikai illetve klinikai vizsgálatoknak kell megerősítenie.

## VII. Összefoglalás

A *C. parapsilosis sensu lato* fajt molekuláris biológiai módszerekkel a *C. parapsilosis sensu stricto*, a *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* fajokra különítették. Ez utóbbi két faj *in vitro* antifungális érzékenysége, az irodalmi adatok alapján eltér a *C. parapsilosis sensu stricto* fajétól, azonban terápiás ajánlások jelenleg csak a *C. parapsilosis sensu stricto* ellen ismertek.

Munkánk során először elvégeztük az idő-ölés görbék felvételét az amphotericin B, a fluconazol, a voriconazol, a posaconazol, és az 5-fluorocytosin ellen. Az amphotericin B a csoport mindhárom tagja ellen 1-4 µg/mL koncentrációkon fungicid hatású volt. A fluconazol, a „*psilosis*” csoport minden tagjával szemben ≤8 µg/mL koncentráción, fungisztatikus hatású volt. A voriconazol, a posaconazol és az 5-fluorocytosin a vérben még elérhető koncentrációkon kitűnő fungisztatikus hatást mutattak a „*psilosis*” csoport mindhárom tagja ellen, bár több *C. orthopsilosis* izolátum csak 4-8×MIC voriconazol koncentrációkon volt gátolható.

Az átmenetileg neutropéniássá tett egerek esetén, a „*psilosis*” csoport tagjai ellen a napi 1 mg/kg amphotericin B, a napi 10 mg/kg és 20 mg/kg fluconazol kezelés szignifikánsan csökkentette a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számát, így mind a fluconazol, mind pedig az amphotericin B hatékonynak bizonyult. Bár a „*psilosis*” csoport tagjai a glukán szintetáz enzimben megtalálható aminosav-csere miatt kevésbé számítanak érzékenyek az echinocandinok ellen, a napi 5 mg/kg caspofungin adagolás hatékony volt a három gombafaj minden izolátuma ellen.

Mivel a rutin diagnosztikai módszerek jelenleg nem alkalmasak a „*psilosis*” csoportba tartozó három faj pontos elkülönítésére, ezért a sikeres terápiát megalapozó *in vitro* érzékenységi vizsgálatok, az újabb érzékenységi határértékek felhasználásával segíthetik a kevésbé ismert fajok okozta fertőzések eredményes kezelését. Az *in vitro* és *in vivo* eredményeink azt mutatják, hogy a *C. parapsilosis sensu stricto*, a *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* fajok okozta fertőzések kezelése alapvetően nem különböznek egymástól, azaz a beteg klinikai állapotától függően a fluconazol, az amphotericin B és a caspofungin is alkalmazható terápiás alternatívának számít.

## VIII. Summary

The *C. parapsilosis sensu lato* species was separated into *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* using molecular biological methods. According to the literature the *in vitro* antifungal susceptibility of the latter two species differ from the *C. parapsilosis sensu stricto*'s, however treatment guidelines only known for the *C. parapsilosis sensu stricto*.

First we performed time-kill studies with amphotericin B, fluconazole, voriconazole, posaconazole and 5-fluorocytosine in our work. Against all of the three members of the group amphotericin B was fungicidal at 1-4 µg/mL. Fluconazole proved to be fungistatic at ≤8 µg/mL concentrations against all of the members of the „*psilosis*” group. Voriconazole, posaconazole and 5-fluorocytosine showed excellent fungistatic activity against all of the three members of the group at concentrations still attainable in the blood. However most *C. orthopsilosis* isolates were only inhibited at 4-8×MIC voriconazole concentrations.

In case of the temporarily neutropenic mice 1 mg/kg daily amphotericin B 10 and 20 mg/kg daily fluconazole treatments significantly reduced the tissue fungal burden against all of the members of the „*psilosis*” group, thus both fluconazole and amphotericin B proved to be efficacious. Although the members of the „*psilosis*” group have reduced echinocandin susceptibilities due to the amino-acid change in the glucan synthase enzyme, the daily dosage of 5 mg/kg CAS was effective against all of the isolates of the three species.

The basis of a successful treatment is the *in vitro* susceptibility testing which together with the recent susceptibility breakpoints can help to effectively cure the infections caused by the less known species as the routine diagnostic methods are currently not capable of the accurate separation of the „*psilosis*” group. Our *in vitro* and *in vivo* results show that the treatment of the *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* infections do not differ basically, thus depending on the clinical status of the patients fluconazole, amphotericin B and also caspofungin are considered as applicable therapeutic alternatives.

## **IX. Köszönetnyilvánítás**

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Majoros László egyetemi docensnek, hogy lehetőséget biztosított doktori munkám elvégzéséhez, valamint hasznos és értékes tanácsokkal segítette szakmai fejlődésemet.

Köszönettel tartozom Dr. Kónya József intézetvezetőnek, hogy engedélyezte doktori disszertációm elkészítését a DE-OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézetben.

Köszönöm Orosz-Tóth Katalinnak az egerek iv. oltását, valamint Hartman Zsoltnak a táptalajkonyhán végzett gyors és megbízható munkáját. Köszönet illeti Dr. Kardos Gábort a szakmai tanácsokért és Dr. Gesztelyi Rudolfot, aki statisztikai oldalról segítette munkámat.

Köszönöm Pappné Falusi Erzsébetnek és dr. Szabó Zsuzsannának a laboratóriumi munkákba való betanítást, a gyakorlatias tanácsokat.

Hálával tartozom az Orvosi Mikrobiológiai Intézet PhD hallgatóinak (Dr. Földi Richard, Kovács Renátó, Mózes Julianna, Dr. Sedigh Bayegan) és szakdolgozóinak, akik készségesen és lelkesen segítettek a laboratóriumi munkák során.

Hálával tartozom továbbá Dr. Hegedűs Nikolettának, Dr. Leiter Évának és Dr. Pócsi Istvánnak, azért, hogy elindítottak a mikrobiológiai kutatások területén és megismertették velem a kutatómunka alapjait.

Végül köszönöm családom gondoskodó támogatását, amely szintén hozzájárult a dolgozat elkészítéséhez.

## X. Irodalomjegyzék

**Abi-Said D**, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. Clin. Infect. Dis. 1997, 24:1122-1128.

**Alam FF**, Mustafa AS, Khan ZU. Comparative evaluation of (1, 3)-beta-D-glucan, mannan and antimannan antibodies, and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia. BMC. Infect. Dis. 2007, 7:103.

**Almirante B**, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M, Saballs P, Fridkin SK, Morgan J, Rodriguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A; Barcelona Candidemia Project Study Group. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. J. Clin. Microbiol. 2005, 43(4):1829-35.

**Almirante B**, Rodríguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, Alonso-Tarres C, Rodriguez-Tudela JL, Pahissa A. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. J. Clin. Microbiol. 2006, 44(5): 1681-5.

**Anaissie E**, Hachem R, Tin U. Experimental hematogenous candidiasis caused by *Candida krusei* and *Candida albicans*: Species differences in pathogenicity. Infect. Immun. 1993, 61(4):1268–1271.

**Anaissie E**, Rex JH, Uzun O. Predictors of adverse outcome in cancer patients with candidemia. Am. J. Med. 1998, 104(3):238–245.

**Andes D**, van Ogtrop L. Characterization and quantitation of the pharmacodynamics of fluconazole in a neutropenic murine model of disseminated candidiasis. Antimicrob. Agents Chemother. 1999, 43:2116–2120.

**Andes D**, Marchillo K, Stamstad T, Conklin R. *In vivo* pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new triazole, voriconazole, in a murine candidiasis model. Antimicrob. Agents. Chemother. 2003, 47(10):3165-9.

**Andes D**, Marchillo K, Conklin R, Krishna G, Ezzet F, Cacciapuoti A, Loebenberg D. Pharmacodynamics of a new triazole, posaconazole, in a murine model of disseminated candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48(1):137-42.

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

**Arendrup M**, Horn T, Frimodt-Møller N. *In vivo* pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. *Infection.* 2002, 30(5):286-91.

**Arendrup MC**, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, Schønheyder HC, Knudsen JD, Jensen IM, Bruun B, Christensen JJ, Johansen HK. Semi-national surveillance of fungaemia in Denmark 2004-2006: increasing incidence of fungaemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008, 14(5):487-94.

**Arendrup MC**, Kahlmeter G, Rodriguez-Tudela JL, Donnelly JP. Breakpoints for susceptibility testing should not divide wild-type distributions of important target species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, 53:1628–1629.

**Arendrup MC**, Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr. Opin. Crit. Care.* 2010, 16(5):445-52.

**Arendrup MC**, National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49:325–334.

**Ashford**, Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1928, 8:507-538.

**Asmundsdottir LR**, Erlendsdottir H, Gottfredsson M. Increasing incidence of candidemia: results from a 20-year nationwide study in Iceland. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40:3489-3492.

**Baillie GS**, Douglas LJ. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 1999, 48:671-679.

**Barchiesi F**, Spreghini E, Tomassetti S, Della Vittoria A, Arzeni D, Manso E, Scalise G. Effects of caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50:2719-2727.

**Barchiesi F**, Spreghini E, Tomassetti S, Giannini D, Scalise G. Caspofungin in combination with amphotericin B against *Candida parapsilosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, 51(3):941-945.

**Bartizal K**, Gill CJ, Abruzzo GK, Flattery AM, Kong L, Scott PM, Smith JG, Leighton CE, Bouffard A, Dropinski JF, Balkovec J. *In vitro* preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872). *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997, 41:2326-2332.

**Bassetti M**, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari MP, Rosso R, Pallavicini FB, Viscoli C. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC. Infect. Dis.* 2006, 10;6:21.

**Bassetti M**, Ansaldi F, Nicolini L, Malfatto E, Molinari MP, Mussap M, Rebesco B, Bobbio Pallavicini F, Icardi G, Viscoli C. Incidence of candidaemia and relationship with fluconazole use in an intensive care unit. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009, 64(3):625-629.

**Bedini A**, Venturelli C, Mussini C, Guaraldi G, Codeluppi M, Borghi V, Rumpianesi F, Barchiesi F, Esposito R. Epidemiology of candidaemia and antifungal susceptibility patterns in an Italian tertiary-care hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006, 12(1): 75-80.

**Benjamin DK Jr**, Ross K, McKinney RE Jr. When to suspect fungal infection in neonates: A clinical comparison of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* fungemia with coagulase-negative staphylococcal bacteremia. *Pediatrics* 2000, 106(4):712–718.

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

**Binder U**, Lass-Flörl C. Epidemiology of invasive fungal infections in the mediterranean area. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2011, 3(1):e20110016.

**Blumberg HM**, Jarvis WR, Soucie JM, Edwards JE, Patterson JE, Pfaller MA, Rangel-Frausto MS, Rinaldi MG, Saiman L, Wiblin RT, Wenzel RP, NEMIS Study Group. Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. *Clin. Infect. Dis.* 2001, 33:177-186.

**Blyth CC**, Chen SC, Slavin MA, Serena C, Nguyen Q, Marriott D, Ellis D, Meyer W, Sorrell TC. Not just little adults: candidemia epidemiology, molecular characterization, and antifungal susceptibility in neonatal and pediatric patients. *Pediatrics* 2009, 123:1360–1368.

**Bodey GP**, Luna M. Skin lesions associated with disseminated candidiasis. *JAMA* 1974, 229(11): 1466–1468.

**Borghi E**, Sciota R, Iatta R, Biassoni C, Montagna MT. Characterization of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from invasive fungal infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011, 30:1437–1441.

**Bouza E**, Muñoz P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2008, 32(2):S87-91.

**Bowden RA**, Cays M, Gooley T, Mamelok RD, van Burik JA. Phase I study of amphotericin B colloidal dispersion for the treatment of invasive fungal infections after marrow transplant. *J. Infect. Dis.* 1996, 173:1208-15.

**Brielmaier BD**, Casabar E, Kurtzeborn CM, McKinnon PS, Ritchie DJ. Early clinical experience with anidulafungin at a large tertiary care medical center. *Pharmacotherapy* 2008, 28:64-73.

**Brito LR**, Guimaraes T, Nucci M, Rosas RC, Paula Almeida L, Da Matta DA, Colombo AL. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. *Med. Mycol.* 2006, 44(3):261–266.

**Brunel L**, Neugnot V, Landucci L, Boze H, Moulin G, Bigey F, Dubreucq E. High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 2004, 1;111(1):41-50.

**Cantón E**, Espinel-Ingroff A, Peman J, del Castillo L. *In vitro* fungicidal activities of echinocandins against *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C.parapsilosis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2010, 54: 2194–2197.

**Cantón E**, Pemán J, Quindós G, Eraso E, Miranda-Zapico I, Álvarez M, Merino P, Campos-Herrero I, Marco F, de la Pedrosa EG, Yagüe G, Guna R, Rubio C, Miranda C, Pazos C, Velasco D; FUNGEMYCA Study Group. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2011, 55(12):5590-6.

**Cappelletty D**, Eiselstein-McKittrick K. The echinocandins. *Pharmacotherapy*. 2007, 27 (3):369-88.

**Carrillo-Muñoz AJ**, Giusiano G, Ezkurra PA, Quindós G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Esp. Quimioterap*. 2006, 19(2) 130-139.

**Carrillo-Muñoz AJ**, Quindós G, del Valle O, Santos P, Giusiano G, Ezkurra PA, Estivill MD, Casals JB. Activity of caspofungin and voriconazole against clinical isolates of *Candida* and other medically important yeasts by the CLSI M-44A disk diffusion method with Neo-Sensitabs tablets. *Chemotherapy* 2008, 54:38-42.

**Chandrsekhar PH**, Sobel JD. Micafungin: a new echinocandin. *Clin. Infect. Dis*. 2006, 15;42(8):1171-8.

**Chapman SW**, Sullivan DC, Cleary JD. In search of the holy grail of antifungal therapy. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc*. 2008, 119:197-215; 215-6.

**Chen S**, Slavin M, Nguyen Q, Marriott D, Playford EG, Ellis D, Sorrell T. Australian Candidemia Study. Active surveillance for candidemia, Australia. *Emerg. Infect. Dis*. 2006, 12(10):1508-16.

**Chen YC**, Chang SC, Luh KT, Hsieh WC. Stable susceptibility of *Candida* blood isolates to fluconazole despite increasing use during the past 10 years. *J. Antimicrob. Chemother*. 2003, 52:71-77.

**Chen YC**, Lin YH, Chen KW, Lii J, Teng HJ, Li SY. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in Taiwan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2010, 68:284–292.

**Cheng MF**, Yu KW, Tang RB, Fan YH, Yang YL, Hsieh KS, Ho M, Lo HJ. Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia from 1996 to 1999. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2004, 48:33-37.

**Cheung C**, Guo Y, Gialanella P, Feldmesser M. Development of candidemia on caspofungin therapy: a case report. *Infection* 2006, 34:345-348.

**Clancy CJ**, Nguyen MH. Correlation between *In Vitro* Susceptibility Determined by E Test and Response to Therapy with Amphotericin B: Results from a Multicenter Prospective Study of Candidemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43(5):1289–1290.

**Clancy CJ**, Barchiesi F, Falconi DiFrancesco L, Morris AJ, Snyderman DR, Yu VL, Scalise G, Nguyen MH. Clinical manifestations and molecular epidemiology of late recurrent candidemia, and implications for management. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2000, 19:585–592.

**Clark TA**, Slavinski SA, Morgan J, Lott T, Arthington-Skaggs BA, Brandt ME, Webb RM, Currier M, Flowers RH, Fridkin SK, Hajjeh RA. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42:4468-4472.

**Clerihew L**, Lamagni TL, Brocklehurst P, McGuire W. *Candida parapsilosis* infection in very low birthweight infants. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal ed.* 2007, 92:F127-F129.

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

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

**Cornely OA**, Maertens J, Winston DJ, Perfect J, Ullmann AJ, Walsh TJ, Helfgott D, Holowiecki J, Stockelberg D, Goh YT, Petrini M, Hardalo C, Suresh R, Angulo-Gonzalez D. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N. Engl. J. Med.* 2007, 356(4):348-59.

**Costa-de-Oliveira S**, Pina-Vaz C, Mendonca D, Goncalves RA. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008, 27:365–374.

**Dagdeviren M**, Cerikcioglu N, Karavus M. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients. *Mycoses* 2005, 48:321-326.

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

**Deray G**. Amphotericin B nephrotoxicity. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002, 49(1):37-41.

**Deresinski SC**, Stevens DA. Caspofungin. *Clin. Infect. Dis.* 2003, 1;36(11):1445-57.

**de Toro M**, Torres MJ, Maite R, Aznar J. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011, 17(3):418-24.

**de Wet N**, Llanos-Cuentas A, Suleiman J. 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.* 2004, 39:842-9.

**Diekema DJ**, Pfaller MA. Nosocomial candidemia: an ounce of prevention is better than a pound of cure. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2004, 25:624-626.

**Diekema DJ**, Messer SA, Hollis RJ, Boyken LB, Tendolkar S, Kroeger J, Pfaller MA. Evaluation of Etest and disk diffusion methods compared with broth microdilution antifungal susceptibility testing of clinical isolates of *Candida spp.* against posaconazole. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45(6):1974-7.

**Diekema DJ**, Messer SA, Boyken LB, Hollis RJ, Kroeger J, Tendolkar S, Pfaller MA. *In vitro* activity of seven systemically active antifungal agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. *J. Clin. Microbiol.* 2009, 47(10):3170-7.

**Diflucan** [betegtájékoztató]. New York, NY: Roerig, a division of Pfizer, Inc.; 2008

**Desnos-Ollivier M**, Dromer F, Dannaoui E. Detection of caspofungin resistance in *Candida* spp. By Etest. J. Clin. Microbiol. 2008, 46(7):2389-2393.

**Dodds Ashley ES**, Lewis R, Lewis JS, Martin C, Andes D. Pharmacology of Systemic Antifungal Agents. Clin. Infect. Dis. 2006, 43(1): S28-S39.

**Dupont B**, Overview of the lipid formulations of amphotericin B. J. Antimicrob. Chemother. 2002, 49(1):31-36.

**Eichel M**, Just-Nubling G, Helm EB, Stille W. Itraconazole suspension in the treatment of HIV-infected patients with fluconazole-resistant oropharyngeal candidiasis and esophagitis. Mycoses 1996, 39(1):102-6.

**Ellis D**, Amphotericin B: spectrum and resistance. J. Antimicrob. Chemother. 2002, 49(1):7-10.

**Ernst EJ**, Yodoi K, Roling E. 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. 2002, 46:578-581.

**Eschenauer G**, Depistel DD, Carver PL. Comparison of echinocandin antifungals. Ther. Clin. Risk Manag. 2007, 3(1):71-97.

**Espinel-Ingroff A**. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. Rev. Iberoam. Micol. 2008, 25(2):101-6.

**EUCAST** definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. Clin. Microbiol. Infect. 2008, 14:398–405.

**EUCAST** technical note on fluconazole. Clin. Microbiol. Infect. 2008, 14:193–195.

**EUCAST** technical note on voriconazole. Clin. Microbiol. Infect. 2008, 14:985–987.

**Fairchild KD**, Tomkoria S, Sharp EC, Mena FV. Neonatal *Candida glabrata* sepsis: Clinical and laboratory features compared with other *Candida* species. Pediatr. Infect. Dis. J. 2002, 21(1):39–43.

- Farowski F**, Vehreschild JJ, Cornely OA. Posaconazole: A next-generation triazole antifungal. *Future Microbiol.* 2007, 2:231–243.
- Feja KN**, Wu F, Roberts K, Loughrey M, Nesin M, Larson E, Della-Latta P, Haas J, Cimiotti J, Saiman L. Risk factors for candidemia in critically ill infants: A matched case-control study. *J. Pediatr.* 2005, 147(2):156–161.
- Fell JW**, Meyer SA. Systematics of yeast species in the *Candida parapsilosis* group. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 1967, 32:177-193.
- Fernanado PH**, Panagoda GJ, Samaranayake LP. The relationship between the acid and alkaline phosphatase activity and the adherence of clinical isolates of *Candida parapsilosis* to human buccal epithelial cells. *APMIS* 1999, 107:1034-1042.
- Fidel PL Jr**, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999, 12:80-96.
- Fine JD**, Miller JA, Harrist TJ, Haynes HA. Cutaneous lesions in disseminated candidiasis mimicking ecthyma gangrenosum. *Am. J. Med.* 1981, 70(5):1133–1135.
- Flattery AM**, Hickey E, Gill CJ, Powles MA, Misura AS, Galgoci AM, Ellis JD, Zhang R, Sandhu P, Ronan J, Abruzzo GK. Efficacy of caspofungin in a juvenile mouse model of central nervous system candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011, 55:3491-3497.
- Fleck R**, Dietz A, Hof H. *In vitro* susceptibility of *Candida* species to five antifungal agents in a German university hospital assessed by the reference broth microdilution method and Etest. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007, 59:767-771.
- Fleischhacker M**, Radecke C, Schulz B, Ruhnke M. Paradoxical growth effects of the echinocandins caspofungin and micafungin, but not of anidulafungin, on clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Eur J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008, 27:127-31.
- Forrest GN**, Weekes E, Johnson JK. Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. *J. Infect.* 2008, 56(2):126-9.

**Földi R**, Kovács R, Gesztelyi R, Kardos G, Berényi R, Juhász B, Szilágyi J, Mózes J, Majoros L. Comparison of *In Vitro* and *In Vivo* Efficacy of Caspofungin Against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*. *Mycopathologia*. 2012, 174(4) 311-318;

**Fradin C**, De Groot P, MacCallum D, Schaller M, Klis F, Odds FC, Hube B. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol. Microbiol.* 2005, 56:397–415.

**Francis P**, Walsh TJ. Evolving role of flucytosine in immunocompromised patients: new insights into safety, pharmacokinetics, and antifungal therapy. *Clin. Infect. Dis.* 1992, 15:1003-1018.

**Fridkin SK**. The changing face of fungal infections in health care settings. *Clin. Infect. Dis.* 2005, 41:1455-1460.

**Fridkin SK**, Kaufman D, Edwards JR, Shetty S, Horan T. Changing incidence of *Candida* bloodstream infections among NICU patients in the United States: 1995-2004. *Pediatrics* 2006, 117:1680-1687.

**Fulurija A**, Ashman RB, Papadimitriou JM. Neutrophil depletion increases susceptibility to systemic and vaginal candidiasis in mice, and reveals differences between brain and kidney in mechanisms of host resistance. *Microbiology*. 1996, 142 (12):3487-96.

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

**Garcia-Effron G**, Park S, Perlin DS. Correlating echinocandin MIC and kinetic inhibition of fks1 mutant glucan synthases for *Candida albicans*: implications for interpretive breakpoints. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, 53:112–12.

**Garcia-Effron G**, Cantón E, Pemán J, Dilger A, Romá E, Perlin DS. Assessment of two new molecular methods for identification of *Candida parapsilosis sensu lato* species. *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49:3257–3261.

**Gácsér A**, Scháfer W, Nosanchuk JS, Salomon S, Nosanchuk JD. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Gen. and Biol.* 2007, 44:1336-1341.

**Girmenia C**, Martino P, De Bernardis F, Gentile G, Boccanera M, Monaco M, Antonucci G, Cassone A. Rising incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patients with hematologic malignancies: clinical aspects, predisposing factors, and differential pathogenicity of the causative strains. *Clin. Infect. Dis.* 1996, 23(3):506-14.

**Ghannoum MA**, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol Rev.* 1999, 12(4): 501-17.

**Ghannoum MA**. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000, 13:122-143.

**Ghannoum MA**, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42(1): 490.

**Ghannoum MA**, Perfect JR. *Antifungal Therapy*. Informa Healthcare. 2010.

**Glöckner A**. Treatment and prophylaxis of invasive candidiasis with anidulafungin, caspofungin and micafungin:review of the literature. *Eur. J. Med. Res.* 2011, 28;16(4):167-79.

**Godoy P**, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Almeida LP, da Matta DA, Colombo AL. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2003, 98: 401–405.

**Goldman M**, Cloud GA, Wade KD. A randomized study of the use of fluconazole in continuous versus episodic therapy in patients with advanced HIV infection and a history of oropharyngeal candidiasis: AIDS Clinical Trials Group Study 323/Mycoses Study Group Study 40. *Clin. Infect. Dis.* 2005, 41:1473-80.

**Gomez-Lopez A**, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Barcelona Candidemia Project Study Group. Prevalence and

susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, 52(4):1506-9.

**Gomez J**, García-Vázquez E, Espinosa C, Ruiz J, Canteras M, Hernández-Torres A, Baños V, Herrero JA, Valdés M. Nosocomial candidemia at a general hospital: the change of epidemiological and clinical characteristics. A comparative study of 2 cohorts (1993-1998 versus 2002-2005). *Rev. Iberoam. Micol.* 2009, 26:184–188.

**Goncalves SS**, Amorim CS, Nucci M, Padovan ACB, Briones MRS, Melo ASA, Colombo AL. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010, 16:885-887.

**Groll AH**, Piscitelli SC, Walsh TJ. Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: A comprehensive review of agents in clinical use, current investigational compounds, and putative targets for antifungal drug development. *Adv. Pharmacol.* 1998, 44:343–500.

**Gumbo T**, Isada CM, Hall G, Karafa MT, Gordon SM. *Candida glabrata* fungemia: clinical features of 139 patients. *Medicine (Baltimore)*, 1999, 78:220-227.

**Hajjeh RA**, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, Phelan M, Morgan J, Lee-Yang W, Ciblak MA, Benjamin LE, Sanza LT, Huie S, Yeo SF, Brandt ME, Warnock DW. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42(4):1519-27.

**Hanada M**, Imaoka H, Oshita Y, Rikimaru T, Aizawa H. Successful treatment with micafungin in a case of candidemia associated with pneumonia. *Kansenshogaku Zasshi* 2005, 79:284-289.

**Hawser SP**, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infect. Immun.* 1994, 62:915-921.

**Hazen KC**. New and emerging yeast pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995, 8:462-478.

**Heidemann HT**, Brune KH, Sabra R. Acute and chronic effects of flucytosine on amphotericin B nephrotoxicity in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992, 36(12):2670–2675.

**Hernández-Castro R**, Arroyo-Escalante S, Carrillo-Casas EM, Moncada-Barrón D, Alvarez-Verona E, Hernández-Delgado L, Torres-Narváez P, Lavallo-Villalobos A. Outbreak of *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: a health care workers source. *Eur. J. Pediatr.* 2010, 169(7):783-7.

**Hope WW**, Morton A, Eisen DP. Increase in prevalence of nosocomial non-*Candida albicans* candidaemia and the association of *Candida krusei* with fluconazole use. *J. Hosp. Infect.* 2002, 50:56–65.

**Hope WW**, Taberner L, Denning DW, Anderson MJ. Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48:4377-4386.

**Hope WW**, Drusano GL, Moore CB, Sharp A, Louie A, Walsh TJ, Denning DW, Warn PA. Effect of Neutropenia and Treatment Delay on the Response to Antifungal Agents in Experimental Disseminated Candidiasis *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, 51(1):285–295.

**Hope WW**, Drusano GL. Antifungal pharmacokinetics and pharmacodynamics: bridging from the bench to bedside. *Clin. Microbiol. Infect.* 2009, 15:602-612.

**Horn DL**, Neofytos D, Fishman J, Steinbach W, Anaisie E, Marr KA, Pfaller M, Olyaei A. Use of the PATH Alliance database to measure adherence to IDSA guidelines for the therapy of candidemia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2007, 26(12):907-14.

**Horn DL**, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, Marr KA, Pfaller MA, Chang CH, Webster KM. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin. Infect. Dis.* 2009, 15;48(12):1695-703.

**Hrusková-Heidingsfeldová O**, Dostál J, Majer F, Havlíková J, Hradilek M, Pichová I. Two aspartic proteinases secreted by the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* differ in expression pattern and catalytic properties. *Biol. Chem.* 2009, 390(3):259-68.

- Hsueh PR**, Lau YJ, Chuang YC, Wan JH, Huang WK, Shyr JM, Yan JJ, Yu KW, Wu JJ, Ko WC, Yang YC, Liu YC, Teng LJ, Liu CY, Luh KT. Antifungal susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species from Taiwan: surveillance of multicenter antimicrobial resistance in Taiwan program data from 2003. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49:512-517.
- Huang YC**, Lin TY, Leu HS, Peng HL, Wu JH, Chang HY. Outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia in neonatal intensive care units: clinical implications and genotyping analysis. *Infection.* 1999, 27(2):97-102.
- Hube B**, Stehr F, Bossenz M, Mazur A, Kretschmar M, Schafer W. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch. Microbiol.* 2000, 174:362-374.
- Ingham CJ**, Schneeberger PM. Microcolony imaging of *Aspergillus fumigatus* treated with echinocandins reveals both fungistatic and fungicidal activities. *PLoS One.* 2012, 7(4):e35478.
- Iwen PC**, Kelly DM, Reed EC, Hinrichs SH. Invasive infection due to *Candida krusei* in immunocompromised patients not treated with fluconazole. *Clin. Infect. Dis.* 1995, 20:342-347.
- Jayatilake JA**, Samaranayake YH, Samaranayake LP. An ultrastructural and a cytochemical study of candidal invasion of reconstituted human oral epithelium. *J. Oral Pathol. Med.* 2005, 34:240-246.
- Johnson LB**, Kauffman CA. Voriconazole: A new triazole antifungal agent. *Clin. Infect. Dis.* 2003, 36(5):630–637.
- Kabbara N**, Lacroix C. Breakthrough *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii* blood stream infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients receiving long-term caspofungin therapy. *Haematologica.* 2008, 93:39–40.
- Kantarcioglu AS**, Yucel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 2002, 45:160-165.

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

**Kappstein I**, Krause G, Hauer T. Pseudo-outbreak of candidaemia with *Candida parapsilosis*. *J. Hosp. Infect.* 1998, 40(2):164–165.

**Kataoka M**, Delacruz-Hidalgo AR, Akond MA, Sakuradani E, Kita K, Shimizu S. Gene cloning and overexpression of two conjugated polyketone reductases, novel aldo-keto reductase family enzymes, of *Candida parapsilosis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 64(3):359-66.

**Katragkou A**, Chatzimoschou A, Simitsopoulou M, Dalakiouridou M, Diza-Mataftsi E, Tsantali C, Roilides E. Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, 52:357-360.

**Kern L**, de Montigny J, Lacroute F, Jund R. Regulation of the pyrimidine salvage pathway by the *FUR1* gene product of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 1991, 19(5):333-7.

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

**Koga-Ito CY**, Lyon JP, Resende MA. Comparison between E-test and CLSI broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* oral isolates. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 2008, 50(1):7-10.

**Kontoyiannis DP**, Luna MA, Samuels BI. Hepatosplenic candidiasis. A manifestation of chronic disseminated candidiasis. *Infect. Dis. Clin. North Am* 2000, 14(3):721–739.

**Kontoyiannis DP**, Vaziri I, Hanna HA, Boktour M, Thornby J, Hachem R, Bodey GP, Raad II. Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. *Clin. Infect. Dis.* 2001, 33:1676-1681.

**Krause DS**, Simjee AE, van Rensburg C. A randomized, double-blind trial of anidulafungin versus fluconazole for the treatment of esophageal candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* 2004, 39:770-5.

**Kuhn DM**, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect. Immun.* 2002/a, 70(2):878-88.

**Kuhn DM**, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002/b, 46:1773-1780.

**Kullberg BJ**, Sobel JD, Ruhnke M, Pappas PG, Viscoli C, Rex JH, Cleary JD, Rubinstein E, Church LW, Brown JM, Schlamm HT, Oborska IT, Hilton F, Hodges MR. Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidaemia in non-neutropenic patients: A randomised non-inferiority trial. *Lancet* 2005, 366(9495):1435–1442.

**Kuse ER**, Chetchotisakd P, da Cunha CA. Micafungin versus liposomal amphotericin B for candidaemia and invasive candidosis: a phase III randomised double-blind trial. *Lancet* 2007, 369:1519-27.

**Laffey SF**, Butler G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology* 2005, 151:1073-1081.

**Laniado-Laborín R**, Cabrales-Vargas MN. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev. Iberoam. Micol.* 2009, 31;26(4):223-7.

**Larsen RA**, Bauer M, Weiner JM, Diamond DM, Leal ME, Ding JC, Rinaldi MG, Graybill JR. Effect of fluconazole on fungicidal activity of flucytosine in murine cryptococcal meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996, 40(9):2178–2182.

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

**Lattif AA**, Mukherjee PK, Chandra J, Swindell K, Lockhart SR, Diekema DJ, Pfaller MA, Ghannoum MA. Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis*. *International Journal of Medical Microbiology* 2009, 300: 265-270.

**Laupland KB**, Gregson DB, Church, DL Ross T, Elsayed S. Invasive *Candida* species infections: a 5 year population-based assessment. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005, 56:532-537.

**Lee JK**, Koo BS, Kim SY. Cloning and characterization of the *xy11* gene, encoding an NADH-preferring xylose reductase from *Candida parapsilosis*, and its functional expression in *Candida tropicalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69(10):6179-88.

**Lehrnbecher T**, Frank C, Engels K, Kriener S, Groll AH, Schwabe D. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J. Infect.* 2010, 61(3):259-65.

**Leroy O**, Gangneux JP, Montravers P, Mira JP, Gouin F, Sollet JP, Carlet J, Reynes J, Rosenheim M, Regnier B, Lortholary O; AmarCand Study Group. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit. Care Med.* 2009, 37(5):1612.

**Letscher-Bru V**, Herbrecht R. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003, 51(3):513-21.

**Levin AS**, Costa SF, Mussi NS, Basso M, S. Sinto I, Machado C, Geiger C, Villares MC, Schreiber AZ, Barone AA, Branchini ML. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1998, 30:243-249.

**Lewis RE**, Klepser ME, Pfaller ME. *In vitro* pharmacodynamic characteristics of flucytosine determined by time-kill methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2000, 36:101-105.

**Lewis RE**, Wiederhold NP. The solubility ceiling: a rationale for continuous infusion amphotericin B therapy? *Clin. Infect. Dis.* 2003, 37: 871-872.

**Lewis RE**, Viale P, Kontoyiannis DP. The potential impact of antifungal drug resistance mechanisms on the host immune response to *Candida*. *Virulence.* 2012, 1;3(4).

**Lin D**, Wu LC, Rinaldi MG, Lehman PF. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 1815–1821.

- Lin MY**, Carmeli Y, Zumsteg J, Flores EL, Tolentino J, Sreeramoju P, Weber SG. Prior antimicrobial therapy and risk for hospital-acquired *Candida glabrata* and *Candida krusei* fungemia: a case-case-control study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49:4555-4560.
- Lionakis MS**, Lim JK, Lee CC, Murphy PM. Organ-specific innate immune responses in a mouse model of invasive candidiasis. *J. Innate. Immun.* 2011, 3(2):180-99.
- Lockhart SR**, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *C. orthopsilos* and *C. metapsilosis* in Comparison to the closely related species *C. parapsilosis*. *J. Clin. Microbiol.* 2008, 46: 2659-2664.
- Lockhart SR**, Bolden CB, Iqbal N, Kuykendall RJ. Validation of 24-Hour Flucytosine MIC Determination by Comparison with 48-Hour Determination by the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A3 Broth Microdilution Reference Method *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49(12):4322–4325.
- Lopez Sastre JB**, Coto Cotallo GD, Fernandez CB. Neonatal invasive candidiasis: A prospective multicenter study of 118 cases. *Am. J. Perinatol.* 2003, 20(3):153–163.
- Louie A**, Banerjee P, Drusano GL, Shayegani M, Miller MH. Interaction between fluconazole and amphotericin B in mice with systemic infection due to fluconazole-susceptible or-resistant strains of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43:2841-2847.
- Louie A**, Deziel M, Liu W, Drusano MF, Gumbo T, Drusano GL. Pharmacodynamics of caspofungin in a murine model of systemic candidiasis: importance of persistence of caspofungin in tissues to understanding drug activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49(12):5058-68.
- Lupetti A**, Tavanti A, Davini P, Ghelardi E, Corsini V, Merusi I, Boldrini A, Campa M, Senesi S. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40(7):2363-9.
- MacCallum DM**, Coste A, Ischer F, Jacobsen MD, Odds FC, Sanglard D. Genetic dissection of azole resistance mechanisms in *Candida albicans* and their validation in a mouse model of disseminated infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, 54:1476-83.

**Mahieu LM**, Van Gasse N, Wildemeersch D, Jansens H, Ieven M. Number of sites of perinatal *Candida* colonization and neutropenia are associated with nosocomial candidemia in the neonatal intensive care unit patient. *Pediatr. Crit. Care Med.* 2010, 11(2):240-5.

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

**Majoros L**, Kardos G. Fungicidal activity of azol antifungal agents. *Anti-infective Agents in Medicinal Chemistry* 2008, 7:118-125.

**Majithiya J**, Sharp A, Parmar A, Denning DW, Warn PA. Efficacy of isavuconazole, voriconazole and fluconazole in temporarily neutropenic murine models of disseminated *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009, 63(1):161-6.

**Malani A**, Hmoud J, Chiu L, Carver PL, Bielaczyc A, Kauffman CA. *Candida glabrata* fungemia: experience in a tertiary care center. *Clin. Infect. Dis.* 2005, 41:975-981.

**Mallie M**, Bastide JM, Blancard A, Bonnin A, Bretagne S, Cambon M, Chandenier J, Chauveau V, Couprie B, Datry A, Feuilhade M, Grillot R, Guiguen C, Lavarde V, Letscher V, Linas MD, Michel A, Morin O, Paugam A, Piens MA, Raberin H, Tissot E, Toubas D, Wade A. *In vitro* susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* spp. to voriconazole and other antifungal agents using Etest: results of a French multicentre study. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2005, 25:321-328.

**Marchetti O**, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Ruef C, Garbino J, Calandra T, Glauser MP, Täuber MG, Pittet D. Fungal Infection Network of Switzerland. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clin. Infect. Dis.* 2004, 38:311-320.

**Marco F**, Danés C, Almela M, Jurado A, Mensa J, de la Bellacasa JP, Espasa M, Martínez JA, Jiménez de Anta MT. Trends in frequency and *in vitro* susceptibilities to antifungal agents, including voriconazole and anidulafungin, of *Candida* bloodstream isolates. Results from a six-year study (1996-2001). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2003, 46:259-264.

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

**Medoff G**, Kobayashi GS. Strategies in the treatment of systemic fungal infections. *N. Engl. J. Med.* 1980, 302(3):145–155.

**Merkerova M**, Dostál J, Hradilek M, Pichová I, Hrusková-Heidingsfeldová O. Cloning and characterization of Sapp2p, the second aspartic proteinase isoenzyme from *Candida parapsilosis*. *FEMS Yeast Res.* 2006, 6:1018-1026.

**Messer SA**, Jones RN, Fritsche TR. International surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003.) *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44:1782-1787.

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

**Mikamo H**, Hua YX, Hayasaki Y, Sato Y, Tamaya T. Effects of fluconazole on viable cell count in experimental intraperitoneal *Candida* abscesses. *J. Infect. Chemother.* 2000, 6 (3): 144-7.

**Mikulska M**, Bassetti M, Ratto S, Viscoli C. Invasive candidiasis in non-hematological patients. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2011, 3(1):e2011007.

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

**Mirhendi H**, Bruun B, Schonheyder HC, Christensen JJ, Fursted K, Gahrn-Hansen B, Johansen HK, Nielsen L, Knudsen JD, Arendrup MC. Molecular screening for *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* among Danish *Candida parapsilosis* group blood culture isolates: proposal of a new RFLP profile for differentiation. *J. Med. Microbiol.* 2010, 59:414–420.

**Moudgal V**, Little T, Boikov D, Vazquez J. A. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49:767–769.

**Mora-Duarte J**, Betts R, Rotstein C. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N. Engl. J. Med.* 2002, 347:2020-9.

**Muñoz P**, Burillo A, Pouza E. Environmental surveillance and other control measures in the prevention of nosocomial fungal infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 2001, 7:38–45.

**Nagappan V**, Deresinski S. Reviews of anti-infective agents: posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal agent. *Clin. Infect. Dis.* 2007, 15;45(12):1610-7.

**NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro-in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. *Clin. Infect. Dis.* 1997/a, 24: 235-247.

**NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts: approved standard, M27-A. 1997/b, Wayne, Pa.

**NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard M27-A2. National CCL Wayne (USA) 2002

**NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved guideline M44-A2. NCCLS, Wayne (USA). 2004

**Neu N**, Malik M, Lunding A, Whittier S, Alba L, Kubin C, Saiman L. Epidemiology of candidemia at a children's hospital, 2002 to 2006. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2009, 28:806–809.

**Neofytos D**, Pfaller MA, Diekema DJ, Horn D. A case of recurrent episodes of *Candida parapsilosis* fungemia. *Mycopathologia.* 2006, 162(4):295-8.

**Nguyen MH**, Peacock JE Jr, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, Wagener MM, Rinaldi MG, Yu VL. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am. J. Med.* 1996, 100:617–623.

**Noxafil** [betegtájékoztató]. Kenilworth, NJ: Schering Plough, 2008

**Nucci M**, Colombo AL. Risk factors for breakthrough candidemia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2002, 21:209–211.

**Nucci M**, Marr KA. Emerging fungal diseases. *Clin. Infect. Dis.* 2005, 41 (4):521-6.

**Odds FC**, *Candida* infections: an overview. *Crit. Rev. Microbiol.* 1987, 15:1-5.

**Odio CM**, Araya R, Pinto LE, Castro CE, Vasquez S, Alfaro B, Sàenz A, Herrera ML, Walsh TJ. Caspofungin therapy of neonates with invasive candidiasis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2004, 23:1093-1097.

**Orsi CF**, Colombari B, Blasi E. *Candida metapsilosis* as the least virulent member of the 'C. parapsilosis' complex. *Medical Mycology* 2010, 1024-1033.

**Ostrosky-Zeichner L**, Rex JH, Bennett J, Kullberg BJ. Deeply invasive candidiasis. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 2002, 16(4):821-35.

**Ostrosky-Zeichner L**, Marr KA, Rex JH, Cohen SH. Amphotericin B: time for a new "gold standard". *Clin. Infect. Dis.* 2003/a, 37(3):415-25.

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

**Ostrosky-Zeichner L**, Sable C, Sobel J, Alexander BD, Donowitz G, Kan V, Kauffman CA, Kett D, Larsen RA, Morrison V, Nucci M, Pappas PG, Bradley ME, Major S, Zimmer L, Wallace D, Dismukes WE, Rex JH. Multicenter retrospective development and validation of a clinical prediction rule for nosocomial invasive candidiasis in the intensive care setting. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2007, 26(4):271–276.

**Panagoda GJ**, Ellepola AN, Samaranayake LP. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses* 2001, 44:29-35.

**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. A prospective observational study of candidemia: Epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin. Infect. Dis.* 2003, 37(5):634–643.

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

**Park BJ**, Arthington-Skaggs BA, Hajjeh RA, Iqbal N, Ciblak MA, Lee-Yang W, Hairston MD, Phelan M, Plikaytis BD, Sofair AN, Harrison LH, Fridkin SK, Warnock DW. Evaluation of amphotericin B interpretive breakpoints for *Candida* bloodstream isolates by correlation with therapeutic outcome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50(4):1287-92.

**Peman J**, Cantón E, Gobernado M. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from blood: results of a 2-year multicentre study in Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2005, 24:23–30.

**Perea S**, Patterson TF. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin. Infect. Dis.* 2002, 35:1073-1080.

**Pereira GH**, Müller PR, Szeszs MW, Levin AS, Melhem MS. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans* *Candida* species. *Med. Mycol.* 2010, 48(6):839-42.

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

**Perlin DS**. Antifungal drug resistance: do molecular methods provide a way forward? *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2009, 22:568-73.

**Pfaller MA**, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Doern GV, Brandt ME, Hajjeh RA. *In vitro* susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates to the new triazole antifungal agents BMS-207147, Sch 56592, and voriconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42:3242-3244.

**Pfaller MA**, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, Messer SA, SENTRY Participant Group. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and *in vitro* susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 3254–3259.

**Pfaller MA**, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN; SENTRY Participants Group. Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: Report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2000. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 46(4):1032–1037.

**Pfaller MA**, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ. Activities of fluconazole and voriconazole against 1,586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by broth microdilution, disk diffusion, and Etest methods: report from the ARTEMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001. *J. Clin. Microbiol.* 2003/a, 41:1440-1446.

**Pfaller MA**, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location. *J. Clin. Microbiol.* 2003/b, 41:2176-2179.

**Pfaller MA**, Diekema DJ, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ. Evaluation of the Etest and disk diffusion methods for determining susceptibilities of 235 bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole and voriconazole. *J. Clin. Microbiol.* 2003/c, 41(5):1875-80.

**Pfaller MA**, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 2004/a, 42:4419-4431.

**Pfaller MA**, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Further standardization of broth microdilution methodology for *in vitro* susceptibility testing of

casposfungin against *Candida* species by use of an international collection of more than 3, 000 clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2004/b, 42 (7):3117-9.

**Pfaller MA**, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Evaluation of the 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.* 2004/c, 42(11):4977-9.

**Pfaller MA**, Sheehan DJ, Rex JH. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004/d, 17(2): 268-80.

**Pfaller MA**, Diekema DJ. Twelve years of fluconazole in clinical practice: Global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin Microbiol Infect* 2004/e, 10(1):11–23.

**Pfaller MA**, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselov AV, Tiraboschi N, Nagy E, Gibbs DL. 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.* 2005/a, 43(12):5848–5859.

**Pfaller MA**, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. *In vitro* activities of anidulafungin against more than 2,500 clinical isolates of *Candida* spp., including 315 isolates resistant to fluconazole. *J. Clin. Microbiol.* 2005/b, 43(11):5425-7.

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

**Pfaller MA**, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. *In vitro* susceptibilities of *Candida* spp. to casposfungin: four years of global surveillance. *J. Clin. Microbiol.* 2006/b, 44 (3): 760-3.

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

**Pfaller MA**, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM, Fu W, Colombo AL, Rodriguez-Noriega E, Global Antifungal Surveillance Study. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: An 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J. Clin. Microbiol.* 2007/b, 45:1735–1745.

**Pfaller MA**, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Selection of a surrogate agent (fluconazole or voriconazole) for initial susceptibility testing of posaconazole against *Candida* spp.: results from a global antifungal surveillance program. *J. Clin. Microbiol.* 2008/a, 46(2):551-9.

**Pfaller MA**, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. *In vitro* susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J. Clin. Microbiol.* 2008/b, 46:150-56.

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

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

**Pfaller MA**, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit. Rev. Microbiol.* 2010/a, 36:1-53.

**Pfaller MA**, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 2010/b, 48:1592–1599.

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

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

**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. Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* species. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2011/a, 70:330–343.

**Pfaller MA**, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for posaconazole and voriconazole and *Candida* spp. as determined by 24-hour CLSI broth microdilution. *J. Clin. Microbiol.* 2011/b, 49(2):630-7.

**Pfaller MA**, Espinel-Ingroff A, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. Comparison of the broth microdilution (BMD) method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing with the 24-hour CLSI BMD method for testing susceptibility of *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole by use of epidemiological cutoff values. *J. Clin. Microbiol.* 2011/c, 49:845–850.

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

**Pfaller MA**, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole

antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2011/e, 38(1):65-9.

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

**Pfaller MA,** Espinel-Ingroff A, Cantón 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. 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.* 2012/b, 50(6):2040-6.

**Pichova I,** Pavlickova L, Dostal J, Dolejsi E, Hruskova-Heidingsfeldova O, Weber J, Ruml T, Soucek M. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur. J. Biochem.* 2001, 268:2669-2677.

**Playford EG,** Nimmo GR, Tilse M, Sorrell TC. Increasing incidence of candidaemia: long-term epidemiological trends, Queensland, Australia, 1999-2008. *J. Hosp. Infect.* 2010/a, 76(1):46-51.

**Playford EG,** Lipman J, Sorrell TC. Management of invasive candidiasis in the intensive care unit. *Drugs.* 2010/b, 7;70(7):823-39.

**Poikonen E,** Lyytikäinen O, Anttila VJ, Ruutu P. Candidemia in Finland, 1995-1999. *Emerg. Infect. Dis.* 2003, 9:985-990.

**Pryce TM,** Palladino S, Price DM, Gardam DJ, Campbell PB, Christiansen KJ, Murray RJ. Rapid identification of fungal pathogens in BacT/ALERT, BACTEC, and BBL MGIT media using polymerase chain reaction and DNA sequencing of the internal transcribed spacer regions. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2006, 54:289-297.

**Pujol C,** Pfaller MA, Soll DR. Flucytosine resistance is restricted to a single genetic clade of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48(1):262-6.

**Quindos G**, Ruesga MT, Martin-Mazuelos E, Salesa R, Alonso-Vargas R, Carrillo-Munoz AJ, Brena S, San Millan R, Ponton J. *In-vitro* activity of 5-fluorocytosine against 1,021 Spanish clinical isolates of *Candida* and other medically important yeasts. *Rev. Iberoam. Micol.* 2004, 21:63-69.

**Raad II**, Graybill JR, Bustamante AB, Cornely OA, Gaona-Flores V, Afif C, Graham DR, Greenberg RN, Hadley S, Langston A, Negroni R, Perfect JR, Pitisuttithum P, Restrepo A, Schiller G, Pedicone L, Ullmann AJ. Safety of long-term oral posaconazole use in the treatment of refractory invasive fungal infections. *Clin. Infect. Dis.* 2006, 42:1726-34.

**Ramage G**, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell.* 2005, 4(4):633-8.

**Ramage G**, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* 2006, 6:979-986.

**Reboli AC**, Rotstein C, Pappas PG. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. *N. Engl. J. Med.* 2007, 356:2472-82.

**Redding SW**, Kirkpatrick WR, Saville S, Coco BJ, White W, Fothergill A, Rinaldi M, Eng T, Patterson TF, Lopez-Ribot J. Multiple patterns of resistance to fluconazole in *Candida glabrata* isolates from a patient with oropharyngeal candidiasis receiving head and neck radiation. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41:619-622.

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

**Rex JH**, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Warnock DW. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001, 14(4):643-58.

**Rex JH**, Pfaller MA. Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin. Infect. Dis.* 2002, 35:982–989.

- Richet H**, Roux P, Des Champs C, Esnault Y, Andremont A, the French Candidemia Study Group. Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics. *Clin. Microbiol. Infect.* 2002, 8:405-412.
- Rimek D**, Redetzke K, Singh J, Heinrich K, Kappe R. Performance of the *Candida* mannan antigen detection in patients with fungemia. *Mycoses* 2004, 47(1):23–26.
- Rodero L**, Davel G, Soria M, Vivot W, Córdoba S, Canteros CE, Saporiti A; EMIFN. Multicenter study of fungemia due to yeasts in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 2005, 37(4):189-95.
- Roffey SJ**, Cole S, Comby P, Gibson D, Jezequel SG, Nedderman AN, Smith DA, Walker DK, Wood N. The disposition of voriconazole in mouse, rat, Rabbit, guinea pig, dog, and human. *Drug Metab. Dispos.* 2003, 31:731-741.
- Ruan SY**, Lee LN, Jerng JS, Yu CJ, Hsueh PR. *Candida glabrata* fungaemia in intensive care units. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008, 14(2):136-40.
- Ruchel R**, Boning B, Borg M. Characterization of a secretory proteinase of *Candida parapsilosis* and evidence for the absence of the enzyme during infection *in vitro*. *Infect. Immun.* 1986, 53:411-419.
- Ruchel R**, de Bernardis F, Ray TL, Sullivan PA, Cole GT. *Candida* acid proteinases. *J. Med. Vet. Mycol.* 1992, 30(1):123-132.
- Ruzicka F**, Hola V, Votava M, Tejkalova R. Importance of biofilm in *Candida parapsilosis* and evaluation of its susceptibility to antifungal agents by colorimetric method. *Folia Microbiol.* 2007, 52:209-214.
- Sabatelli F**, Patel R, Mann PA, Mendrick CA, Norris CC, Hare R, Loebenberg D, Black TA, McNicholas PM. *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important mold and yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50:2009-2015.
- Sabino R**, Sampaio P, Carneiro C, Rosado L, Pais C. Isolates from hospital environments are the most virulent of the *Candida parapsilosis* complex. *BMC Microbiol.* 2011, 8;11(1):180.

**Sable CA**, Nguyen BY, Chodakewitz JA. Safety and tolerability of caspofungin acetate in the treatment of fungal infections. *Transpl. Infect. Dis.* 2002, 4:25–30.

**Saiman L**, Ludington E, Pfaller M, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, Dawson J, Blumberg HM, Patterson JE, Rinaldi M, Edwards JE, Wenzel RP, Jarvis W. Risk factors for candidemia in Neonatal Intensive Care Unit patients. The National Epidemiology of Mycosis Survey study group. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2000, 19(4):319–324.

**Saiman L**, Ludington E, Dawson JD, Patterson JE, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, Blumberg HM, Pfaller M, Rinaldi M, Edwards JE, Wenzel RP, Jarvis W; National Epidemiology of Mycoses Study Group. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2001, 20(12):1119–1124.

**Sallah S**, Wan JY, Nguyen NP, Vos P, Sigounas G. Analysis of factors related to the occurrence of chronic disseminated candidiasis in patients with acute leukemia in a non-bone marrow transplant setting: a follow-up study. *Cancer* 2001, 92:1349–1353.

**Sandven P**, Bevanager L, Digraanes A, Haukland HH, Mannsaker T, Gausted P, Norwegian Yeast Study Group. Candidemia in Norway, 1991 to 2003: results from a nationwide study. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44:1977-1981.

**Sautour M**, Dalle F, Olivieri C, L'ollivier C, Enderlin E, Salome E, Chovelon I, Vagner O, Sixt N, Fricker-Pap V, Aho S, Fontaneau O, Cachia C, Bonnin A. A prospective survey of air and surface fungal contamination in a medical mycology laboratory at a tertiary care university hospital. *Am. J. Infect. Control.* 2009, 37:189–194.

**Schaller M**, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 2005, 48:365-377.

**Scherer S**, Stevens DA. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 1987, 25:675–679.

**Segal BH**, Kwon-Chung J, Walsh TJ, Klein BS, Batiwalla M, Almyroudi NG, Holland SM, Romani L. Immunotherapy for fungal infections. *Clin. Infect. Dis.* 2006, 42:507-515.

**Shields RK**, Nguyen MH, Du C, Press E, Cheng S, Clancy CJ. Paradoxical effect of caspofungin against *Candida* bloodstream isolates is mediated by multiple pathways, but eliminated in human serum. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011, 55: 2641-47.

**Shimizu MT**, Almeida NQ, Fantinato V, Unterkircher CS. Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase, proteinase and phospholipase secreted by *Candida* species. *Mycoses* 1996, 39:161-167.

**Sohnle PG**, Hahn BL, Erdmann MD. Effect of fluconazole on viability of *Candida albicans* over extended periods of time. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1996, 40:2622-2625.

**Silva AP**, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J. Clin. Microbiol.* 2009, 47:2392–2397.

**Sims CR**, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH. Invasive candidiasis in immunocompromised hospitalized patients. *Arch. Med. Res.* 2005, 36(6):660–671.

**Singh N**. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. *Clin. Infect. Dis.* 2001, 33:1692–1696.

**Song JW**, Shin JH, Shint DH, Jung SI, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Differences in biofilm production by three genotypes of *Candida parapsilosis* from clinical sources. *Med. Mycol.* 2005, 43:657–661.

**Sóczó G**, Kardos G, McNicholas PM, Balogh E, Gergely L, Varga I, Kelentey B, Majoros L. Correlation of posaconazole minimum fungicidal concentration and time-kill test against nine *Candida* species. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007/a, 60:1004-1009.

**Sóczó G**, Kardos G, McNicholas PM, Falusi E, Gergely L, Majoros L. Posaconazole susceptibility testing against *Candida* species: Comparison of broth microdilution and Etest methods. *Mycoses.* 2007/b, 50:178-182.

**Spellberg BJ**, Filler SG, Edwards JE Jr. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* 2006, 42:244–251.

**Sporanox** [betegtájékoztató]. Titusville, NY: Janssen, 2008

**Stone JA**, Holland SD, Wickersham PJ, Sterrett A, Schwartz M, Bonfiglio C, Hesney M, Winchell GA, Deutsch PJ, Greenberg H, Hunt TL, Waldman SA. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of caspofungin in healthy men. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002, 46:739-745.

**Swoboda S**, Lichtenstern C, Ober MC, Taylor LA, Störzinger D, Michel A, Brobeil A, Mieth M, Hofer S, Sonntag HG, Hoppe-Tichy T, Weigand MA. Implementation of practice guidelines for antifungal therapy in a surgical intensive care unit and its impact on use and costs. *Chemotherapy* 2009, 55:418-424.

**Tavanti A**, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov., to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43:284-92.

**Tavanti A**, Hensgens LA, Ghelardi E, Campa M, Senesi S. Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45: 1455-1462.

**Tay ST**, Na SL, Chong J. Molecular differentiation and antifungal susceptibilities of *Candida parapsilosis* isolated from patients with bloodstream infections. *J. Med. Microbiol.* 2009, 58: 185–191.

**Trofa D**, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008, 21(4):606-25.

**Tumbarello M**, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, de Gaetano Donati K, La Sorda M, Spanu T, Fadda G, Cauda R, Sanguinetti M. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45:1843-1850.

**Turnidge J**, Paterson DL. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007, 20:391–408.

**Ullmann AJ**, Lipton JH, Vesole DH, Chandrasekar P, Langston A, Tarantolo SR, Greinix H, Morais de Azevedo W, Reddy V, Boparai N, Pedicone L, Patino H, Durrant S. Posaconazole

or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.* 2007, (4) 356:335.

**Uzun O**, Ascioğlu S, Anaissie EJ, Rex JH. Risk factors and predictors of outcome in patients with cancer and breakthrough candidemia. *Clin. Infect. Dis.* 2001, 32:1713–1717.

**van Asbeck EC**, Huang YC, Markham AN, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. *Mycopathologia.* 2007, 164(6):287-93.

**van Asbeck EC**, Clemons KV, Martinez M, Tong AJ, Stevens D. Significant differences in drug susceptibility among species in the *Candida parapsilosis* group. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008, 62:106-109.

**van Asbeck EC**, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit. Rev. Microbiol.* 2009, 35(4):283-309.

**Varga I**, Sóczó G, Kardos G, Borbély A, Szabó Z, Kemény-Beke A, Majoros L. Comparison of killing activity of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008, 62(6):1466-8.

**Varga I**, Sóczó G, Kardos G, Kemény-Beke A, Kelentey B, Márton I, Majoros L. Differences in killing activity of caspofungin and paradoxical growth between *C. albicans* and *C. krusei* clinical isolates in different media. *J. Chemother.* 2009, 21:36-41.

**Vaz C**, Sampaio P, Clemons KV, Huang YC, Stevens DA, Pais C. Microsatellite multilocus genotyping clarifies the relationship of *Candida parapsilosis* strains involved in a neonatal intensive care unit outbreak. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2011, 71(2):159-62.

**Vazquez JA**. Anidulafungin: a new echinocandin with a novel profile. *Clin. Ther.* 2005, 27(6):657-73.

**Vazquez JA**, Chen A, Buhari M, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum MA. 2006, Abstr. 8th ASM Conf. *Candida* Candidiasis, abstr. A67.

**Vfend** [betegtájékoztató]. New York, NY: Roerig, 2008

**Villanueva A**, Arathoon EG, Gotuzzo E, Berman RS, DiNubile MJ, Sable CA. A randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin for the treatment of candidal esophagitis. *Clin. Infect. Dis.* 2001, 3:1529-35.

**Villanueva A**, Gotuzzo E, Arathoon EG. A randomized double-blind study of caspofungin versus fluconazole for the treatment of esophageal candidiasis. *Am. J. Med.* 2002, 13:294-9.

**Viscoli C**, Girmenia C, Marinus A, Collette L, Martino P, Vandercam B, Doyen C, Lebeau B, Spence D, Krcmery V, De Pauw B, Meunier F. 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.* 1999, 8(5):1071–1079.

**Waldorf AR**, Polak A. Mechanisms of action of 5-fluorocytosine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1983, 23(1):79-85.

**Walker LA**, Gow NA, Munro CA. Fungal echinocandin resistance. *Fungal. Genet. Biol.* 2010, 7(2):117-26.

**Walsh TJ**, Lee J, Aoki S, Mechinaud F, Bacher J, Lecciones J, Thomas V, Rubin M, Pizzo PA. Experimental basis for use of fluconazole for preventive or early treatment of disseminated candidiasis in granulocytopenic hosts. *Rev. Infect. Dis.* 1990, 12(3):S307–S317.

**Weems JJ Jr.** *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin. Infect. Dis.* 1992, 14:756-766.

**White TC**, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbio. Rev.* 1998, 11:382–402.

**Wiederhold NP.** Attenuation of echinocandin activity at elevated concentrations: a review of the paradoxical effect. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2007, 20(6):574-8.

**Wingard JR**, Merz WG, Rinaldi MG, Johnson TR, Karp JE, Saral R. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N. Engl. J. Med.* 1991, 325(18):1274-7.

**Wingard JR.** Lipid formulations of amphotericins: are you a lumper or a splitter? *Clin. Infect. Dis.* 2002, 35:891-5.

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

**Xiao L**, Madison V, Chau AS. Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14 $\alpha$ -sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48:568-74.

**Zaoutis TE**, Foraker E, McGowan KL, Mortensen J, Campos J, Walsh TJ, Klein JD. Antifungal susceptibility of *Candida* spp. Isolated from pediatric patients: a survey of 4 children's hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2005, 52:295–298.

**Zancope-Oliveira RM**, James MJ, Derossi AP, Sampaio JL, Muniz MM, Li RK, Nascimento AS, Peralta JM, Reiss E. Strain characterization of *Candida parapsilosis* fungemia by molecular typing methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2000, 19:514–520.

## **XI. Tárgyszavak**

Triazol antifungális szerek, amphotericin B, caspofungin, 5-fluorocytosin, idő-ölés kísérletek, in vivo egérkísérletek, „psilosis” csoport, antifungális érzékenység

Triazol antifungals, amphotericin B, caspofungin, 5-fluorocytosine, time-kill curves, in vivo murine experiments, „psilosis” group, antifungal susceptibility

Iktatószám: DEENKÉTK/310/2012.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Szilágyi Judit

Neptun kód: L56GCU

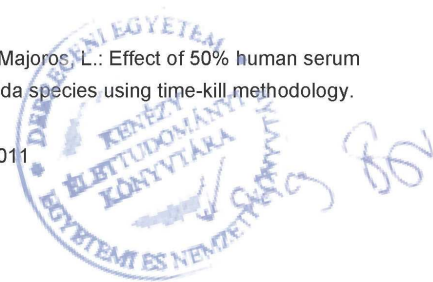
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. 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)
2. Szabó, Z., Szilágyi, J., Tavanti, A., Kardos, G., Rozgonyi, F., Bayegan, S., Majoros, L.: In vitro efficacy of 5 antifungal agents against *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* as determined by time-kill methodology.  
*Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64 (3), 283-288, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.011>  
IF:2.451

### További Közlemények

3. 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)



4. Földi, R., Kovács, R., Gesztelyi, R., Kardos, G., Berényi, R., Juhász, B., **Szilágyi, J.**, Mózes, J., Majoros, L.: Comparison of In Vitro and Vivo Efficacy of Caspofungin Against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*.  
*Mycopathologia*. 174 (4), 311-318, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-012-9554-7>  
IF:1.654 (2011)
5. **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)
6. 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: 10.617

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 4.267

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

Debrecen, 2012.10.26



## XII. Függelék

### Fontosabb előadások, poszterek:

**Szilágyi J**, Bayegan S, Gesztelyi R, Kardos G, Kemény-Beke Á, Szabó ZS, Majoros L. *In vivo* efficacy of fluconazole, voriconazole and caspofungin against *Candida orthopsilosis* in a neutropenic mouse model. 2ND Central European Forum for Microbiology, Keszthely, 2009.

Bayegan S, **Szilágyi J**, Gesztelyi R, Kardos G, Mózes J, Kemény-Beke Á, Szabó Zs, Kovács R, Majoros L. Correlation between postantifungal effect and the efficacy of single 5 and 10 mg/kg caspofungin doses for treatment of disseminated candidiasis caused by *Candida krusei* in a neutropenic mouse model. 2ND Central European Forum for Microbiology, Keszthely, 2009.

Majoros L, **Szilágyi J**, Bayegan S, Tavanti A, Kemény-Beke Á, Kardos G, Adnan A, Gesztelyi R. *In vivo* efficacy of amphotericin B, fluconazole, voriconazole and caspofungin against *Candida orthopsilosis* in a neutropenic mouse model. 4<sup>th</sup> Trends in Medical Microbiology. Athene, 2009.

**Szilágyi J**, Bayegan S, Gesztelyi R, Kardos G, Kemény-Beke Á, Szabó Zs, Majoros L. *In vivo* efficacy of fluconazole and caspofungin against *Candida parapsilosis* and *C. orthopsilosis* in temporarily and deeply neutropenic mouse models. Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, Keszthely, 2010.

Majoros L, Kovács R, Berényi R, **Szilágyi J**, Földi R, Gesztelyi R, Kardos G, Juhász B. *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, Vienna, 2011.