

**Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**

***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

*Candida parapsilosis sensu stricto, Candida orthopsilosis és Candida metapsilosis* izolátumok antifungális érzékenységének *in vitro* és *in vivo* vizsgálata

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

Írta: Szilágyi Judit okleveles környezetkutató (vegyész szakirány)  
és angol-magyar szakfordító

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája  
(Mikrobiológia és farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Majoros László

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Maráz Anna, az MTA doktora  
Dr. Vecsernyés Miklós, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja:

2013. január 11. 11 óra, DEOEC, Gyógyszerhatástani tanszék, Elméleti tömb 5.  
emelet, Könyvtár

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Kovács Péter, kandidátus  
Csányiné dr. Dóczy Ilona, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora  
tagok: Csányiné dr. Dóczy Ilona, Ph.D.  
Prof. Dr. Kovács Péter, kandidátus  
Prof. Dr. Maráz Anna, az MTA doktora  
Dr. Vecsernyés Miklós, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja:

2013. január 11. 13 óra, DEOEC I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

## 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. 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. Ezek közül 1990 óta a *C. parapsilosis* előfordulása nőtt a legnagyobb mértékben.

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. 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.

A *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* fenotípusosan azonosak, genotípusosan viszont eltérnek a *C. parapsilosis sensu stricto* fajtól.

*In vitro* vizsgálatok kimutatták, hogy a *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* antifungális szerekkel szembeni érzékenysége nem egyezik meg a *C. parapsilosis sensu stricto* érzékenységgel. 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. 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*.

A fertőzések sikeres klinikai kimenetelű kezelése csak az időben és megfelelően alkalmazott antifungális szerrel valósítható meg. 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.

Vizsgálataink 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 a caspofungint (CAS) egyre gyakrabban alkalmazzák *Candida* fajok okozta invazív fertőzések kezelésében.

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-fluorocytoszín (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.

## CÉLKITŰZÉS

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 terápiais ajánlás sem létezik az általuk okozott fertőzések kezelésére, ezért munkánkban célul tűztük ki:

- az amphotericin-B, 5-fluorocytosin, fluconazol, voriconazol, posaconazol és 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 neutropéniás 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.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 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. Az olaszországi törzseket Arianna Tavanti (Univeristá 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).

### *In vitro* érzékenységi vizsgálatok

#### A minimális gátló koncentráció meghatározása

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

### **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).

### **E-teszt**

Mivel az E-tesztet tekintik az AMB rezisztens *Candida* fajok legjobb detektálási módszerének, ezért az AMB MIC értékeket E-teszttel is meghatároztuk. 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. Ezeket a szuszpenziókat steril tampon segítségével egyenletesen kikentük az RPMI tápagarok 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.

### **Az idő-ölés görbék felvétele**

Az idő-ölés kísérleteket a Klepser és munkatársai 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×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.

A táptalajt, gombaszuszpenziót, valamint a különböző mennyiségű antifungális szereket tartalmazó csöveket folyamatosan rázatva, 35 °C-os sötét termosztátban 48 óráig inkubáltuk. 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. Abban az esetben, amikor azt sejtettük, hogy a kinőtt telepek száma 1000 CFU/mL mennyiségnél kevesebb lesz, akkor a hígítás nélküli, tenyésztőcsőből is kioltottunk. A detektálás alsó határa 50 CFU/mL. 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. 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). Fungicidnek tekintettük azt a gyógyszert, amely az életképes sejtek számát (CFU) a kiindulási sejtszámhoz képest minimum  $\geq 99,9\%$ -kal ( $\geq 3 \log_{10}$ ) csökkentette. Az ennél kisebb ( $< 99,9\%$ ;  $< 3 \log_{10}$ ) mértékű csíraszám csökkenést okozó antifungális szereket fungisztikus hatásúnak tekintettük.

## ***In vivo* érzékenységi vizsgálatok**

### **Felhasznált egerek**

A vizsgálatainkat 26-28 g 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.

### **A BALB/c típusú egerek átmeneti neutropéniás 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 ceftazidimmel kezeltünk.

### **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 ismét 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 gombasejtekhez. 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.

### **Fertőzés**

Az egerek, a fertőző gomba szuszpenziót (0,2 mL/egér) az immunszuppresszálasuk utáni negyedik napon, a farkuk oldalsó vénájába kapták. Az oltóanyag csíraszama 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.

### **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. A kontroll csoportok 0,5 mL steril fiziológiás sóoldatot kaptak.

### **Szervtenyésztés**

A kvantitatív csíraszám meghatározáshoz a kísérlet 7. napján életben maradt egereket cervikális diszlokációt követően felboncoltuk, a veséiket eltávolítottuk és 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  $\mu$ L mennyiségeket Sabouraud agarra kioltottunk, majd 48 órás, 35 °C-os sötét termosztátban való inkubálást követően a kinőtt telepeket megszámo ltuk. A táptalajon vesékből kitenyészett gombák esetén a szignifikancia számításhoz a Kruskal-Wallis tesztet használtuk. Szignifikánsnak a  $P < 0,05$  értékeket tekintettük.

## EREDMÉNYEK

### **Az *in vitro* érzékenységi vizsgálatok eredményei**

#### **A minimális gátló koncentráció értékei**

Az ATCC tesztörzsek MIC értékei a CLSI megfelelő tartományában találhatóak. A CLSI és E-teszt módszerekkel kapott AMB MIC értékek  $\pm 1$  hígítási fok eltéréssel azonos eredményt adtak és a 0,25-2  $\mu\text{g/mL}$  közötti koncentráció tartományba estek. Az E-teszt esetén 1  $\mu\text{g/mL}$  volt a legmagasabb leolvasott érték. Ezzel a polién típusú antifungális szerrel szemben, a CLSI módszer alapján a *C. orthosporiosis* CP25, míg az E-teszt szerint a *C. metapsporiosis* ATCC 96144 és CP86 törzsek bizonyultak a legérzékenyebbeknek.

A triazolokkal szemben az összes vizsgált izolátum érzékeny volt. A FLU-lal szemben a *C. parapsporiosis sensu stricto* izolátumok nagyobb érzékenységet mutattak (MIC: 0,5-2  $\mu\text{g/mL}$ ), mint a *C. orthosporiosis* és *C. metapsporiosis* fajok (legmagasabb MIC: 8  $\mu\text{g/mL}$ ). A 24 órás leolvasási időpontot alkalmazva az izolátumok MIC értékei 1-4 hígítási fokkal alacsonyabbak voltak, mint a 48 órás leolvasási időpont után. A VOR és POS esetében 0,015-0,12  $\mu\text{g/mL}$  MIC értékeket észleltünk. A legnagyobb VOR érzékenységet (0,015  $\mu\text{g/mL}$ ) a *C. parapsporiosis sensu stricto* 2845 és CP120-as izolátumok, a POS-nál pedig a *C. metapsporiosis* CP5 (0,015  $\mu\text{g/mL}$ ) és CP92 (0,015  $\mu\text{g/mL}$ ) törzsek mutatták.

Az 5-FC MIC értékeket mindegyik tesztelt törzs esetében  $\leq 0,12$   $\mu\text{g/mL}$  koncentráción figyeltük meg. A CAS MIC értékei 24 órás leolvasás után, a két újabban elkülönített *C. orthosporiosis* és *C. metapsporiosis* faj esetében alacsonyabbak voltak (0,12-1  $\mu\text{g/mL}$ ), mint a *C. parapsporiosis sensu stricto* izolátumoké (0,5-2  $\mu\text{g/mL}$ ).

## Az idő-ölés kísérletek eredményei

### Amphotericin B

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).

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. Az 1-4 µg/mL koncentrációjú AMB, 48 óra inkubálási idő elteltével az öt *C. metapsilosis* izolátumból három esetében (CP92, CP86 és 12821) okozott ≥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.

### 5-fluorocytoszín

Az **5-FC** a kiindulási csíraszámhoz képest 99,9%-nál kisebb csíraszám csökkenést, azaz fungisztikus hatást okozott a „*psilosis*” csoport mindhárom tagjának vizsgálatakor. Egyik vizsgált 5-FC koncentráció sem volt fungicid a *C. parapsilosis* ATCC 22019-es számú izolátummal szemben. 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 „*psilosis*” csoport többi tagjához hasonlóan, az 12821-es számú *C. metapsilosis* izolátum esetében sem figyeltük meg a vizsgált 5-FC koncentrációk fungicid hatását.

### **Fluconazol**

A három *Candida* faj vizsgálatakor, a **triazol** antifungális szerek fungisztatikus hatásúak voltak, amelyet a **FLU** már  $\geq 1 \times \text{MIC}$  koncentráción produkált a *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumok ellen. 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. A FLU a *C. orthopsilosis* CP25 izolátumot 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 fungisztatikusán. A FLU fungisztatikus 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.

### **Voriconazol**

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. 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. Míg a *C. metapsilosis* ATCC

96144 tesztörzs növekedését a VOR már  $2\times\text{MIC}$  ( $0,25\ \mu\text{g/mL}$ ) koncentráción gátolta, addig a többi *C. metapsilosis* izolátum szaporodását csak magasabb,  $4-8\times\text{MIC}$  ( $0,25-0,5\ \mu\text{g/mL}$ ) értékű VOR mennyiség akadályozta meg és a kétszeres MIC értékű VOR koncentrációk nem okoztak jelentős fungisztikus hatást.

### **Posaconazol**

A POS a *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* ATCC törzsek ellen  $0,03-0,06\ \mu\text{g/mL}$ , a többi klinikai izolátum ellen alacsonyabb,  $0,015-0,03\ \mu\text{g/mL}$  koncentrációkon okozott növekedésgátlást ( $<99,9\ \%$ -os csíraszámcsökkenést). A  $0,25-0,5\ \mu\text{g/mL}$  ( $4-8\times\text{MIC}$ ) POS koncentrációk a *C. orthopsilosis* CP85 és CP25, valamint a *C. metapsilosis* CP92 klinikai izolátumok vizsgálatokor nagyobb, mint  $1\ \log_{10}$  csíraszám csökkenést eredményeztek ( $1,2-1,48\ \log_{10}$  és  $2,22\ \log_{10}\ \text{CFU/mL}$ ). A *C. parapsilosis* izolátumokat POS-lal, a csoport összes tagját pedig CAS-nal szemben nem teszteltük, ugyanis ezeket az eredményeket munkacsoportunk korábban már publikálta.

### **Az *in vivo* érzékenységi vizsgálatok eredményei**

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

Míg a *C. parapsilosis sensu stricto* 9150 törzsszel fertőzött neutropéniás egérmodellben a napi  $1\ \text{mg/kg}$  FLU dózis hatástalan ( $P>0,05$ ) volt, addig a napi  $5, 10$  ( $P<0,05$ ) és  $20\ \text{mg/kg}$  ( $P<0,01$ ) FLU szignifikánsan csökkentette a vesékből kinőtt gombák számát. A vizsgált CAS dózisok közül kizárólag a napi  $5\ \text{mg/kg}$  volt hatásos ( $P<0,05$ ). A napi  $1\ \text{mg/kg}$  AMB a vesékből kitenyészett gombákat szintén szignifikánsan csökkentette ( $P<0,001$ ). A 9150-es izolátumhoz hasonlóan, az  $1\ \text{mg/kg}$  dózis kivételével, a FLU valamennyi tesztelt dózisa hatásosnak bizonyult ( $5\ \text{mg/kg}-P<0,05$ ;  $10\ \text{mg/kg}-P<0,01$ ;  $20\ \text{mg/kg}-P<0,001$ ) a

**896/1** törzs esetén. Ezzel az izolátummal szemben az 5 mg/kg mellett a 2 mg/kg napi CAS dózis és ( $P < 0,05$ ) az 1 mg/kg AMB is hatásos volt ( $P < 0,01$ ).

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

A *C. orthopsilosis* **CP25** izolátum esetén a napi 10 és 20 mg/kg FLU ( $P < 0,05$ ), a 2, 5 mg/kg CAS ( $P < 0,01$ ) és az 1 mg/kg AMB dózisok effektívek voltak ( $P < 0,01$ ). A **CP85** izolátum vizsgálatakor, míg az 1 és 5 mg/kg napi FLU hatástalanok ( $P > 0,05$ ), addig a 10 és 20 mg/kg napi dózisok effektívek voltak ( $P < 0,05$ ). Mindhárom CAS napi adag (1, 2, 5 mg/kg- $P < 0,05$ ) és az 1 mg/kg AMB ( $P < 0,001$ ) szignifikánsan csökkentette a kitenyészett gombák számát. A napi 1 mg/kg FLU terápia nem ( $P > 0,05$ ), míg a 10 és 20 mg/kg szignifikáns csíraszám csökkenést okoztak a **CP125** törzssel fertőzött neutropéniás egerekben. Az előző két fajtól (CP25, CP85) eltérően a magasabb, 5 mg/kg napi FLU hatásosnak bizonyult ( $P < 0,05$ ) a CP125-ös törzs ellen. A 2, 5 mg/kg napi CAS és az 1 mg/kg AMB ezzel az izolátummal szemben is effektív volt.

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

A *C. metapsilosis* **CP5** izolátum eredményei legjobban a *C. orthopsilosis* CP25-ös törzssével egyeznek meg; ugyanis mindkét kísérlet esetén a hatástalan, alacsonyabb FLU (1 és 5 mg/kg/nap) mellett a magasabb FLU dózisok (10 és 20 mg/kg) hatásosak voltak ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ). 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 egerekhez képest. A **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 dózisa szignifikáns csíraszám csökkenést okoztak. A **CP92** fajjal fertőzött egérmódelben az 1 mg/kg napi FLU dózis kivételével az összes vizsgált antifungális szer szignifikánsan csökkentette az egerek veséiből kinőtt sejtszámot.

## MEGBESZÉLÉS

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 korábban *C. parapsilosis sensu lato* néven ismert fajt nemrégiben három részre csoportosították: *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis*. A *C. orthopsilosis* incidenciája 2004 óta 2,3 %-ról 9 %-ra, a *C. metapsilosis* gyakorisága pedig 0,9 %-ról 6,9 %-ra nőtt. Az epidemiológiai felmérések alapján a „*psilosis*” csoport leggyakoribb emberi fertőzést okozója a *C. parapsilosis sensu stricto*.

A *C. albicans* fajhoz képest a *C. parapsilosis sensu stricto* kisebb virulenciájú. A virulencia a „*psilosis*” csoporton belül is eltérő, a legvirulensebb a *C. parapsilosis sensu stricto*, a legkevésbé virulens a *C. metapsilosis* faj.

A CLSI nemrég a terápiák eredményességének növelése céljából új, faj-specifikus határértékeket határozott meg az öt leggyakoribb *Candida*, köztük a *C. parapsilosis sensu stricto* fajra is. Ezek az új értékek a régiekhez képest három (FLU), illetve négy (echinocandin) hígítási fokkal is kisebbek lehetnek.

A korábbi, *in vitro* tesztek szerint a „*psilosis*” csoportnak 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. Ez alapján a *C. parapsilosis sensu stricto* érzékenységi határértékei nem biztos, hogy a *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* fajok esetén is sikeresen alkalmazhatóak.

Az *in vitro* vizsgálatainkban tesztelt *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* klinikai izolátumok AMB MIC értékei alacsonyabbak voltak, mint a *C. parapsilosis*

*sensu stricto* izolátumoké. Egyik izolátum AMB MIC értéke sem haladta meg a 2 µg/mL értéket; 24 és 48 óra elteltével az 1-4 µg/mL AMB (0,5-16×MIC) fungicid hatást eredményezett a „*psilosis*” csoport ellen.

Az AMB terápia hatékonyságát leginkább a C<sub>max</sub>/MIC (szérum maximális AMB koncentrációja/MIC) farmakodinamikai paraméter jelzi előre. *In vivo* kísérleteinkben 1 mg/kg AMB mindegyik vizsgált izolátummal szemben hatásos volt és annak ellenére, hogy az alkalmazott 1 mg/kg AMB dózis valamivel magasabb C<sub>max</sub> értéket eredményez egerekben, mint emberekben, az antifungális szer nagymértékű fehérjekötődését figyelembe véve a szabad gyógyszerkoncentrációk összehasonlíthatóak.

*In vitro* kísérleteinkben a 48 órás MIC leolvasási időponttal ellentétben, a 24 órás leolvasást alkalmazva a FLU MIC értékek 1-4 hígítási fokkal alacsonyabbak voltak mindhárom faj esetében. A *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* MIC értékeik megegyeztek, illetve alacsonyabbak voltak, mint a *C. parapsilosis sensu stricto* fajra javasolt új határértékek (2 mg/L).

A régebbi, 8 µg/mL FLU érzékenységi határértéket, a CLSI két hígítási fokkal, 2 µg/mL koncentrációra csökkentette; így a tesztelt *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* izolátumok a 24 órás MIC értékek alapján még érzékenyek tekinthetőek, a 48 órás MIC eredmények szerint viszont nem.

Az idő-ölés vizsgálataink és korábbi megfigyelések alapján a *C. orthopsilosis*, illetve *C. metapsilosis* fertőzések kezelése nagyobb dózisú FLU-t igényel (4-8 µg/mL; ≥2×MIC). Ezzel szemben a *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumokat MIC közeli FLU koncentrációk (0,5-2 µg/mL; ≥1×MIC) is gátolták *in vitro*.

A FLU kezelés hatékonyságát legjobban előrejelző farmakodinamikai paraméter az AUC/MIC (koncentráció görbe alatti terület/MIC). Az *in vivo* kísérletekben mindegyik 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. Ennek magyarázata lehet az is, hogy *in vivo* a FLU koncentráció-független, hosszú ideig tartó posztantifungális aktivitást mutat. Az eredményeink alapján a 24 óra múlva leolvasott FLU MIC értékek jó korrelációt mutattak az *in vivo* hatással, különböző FLU dózisokkal kezelt egérmódelünkben.

A három faj növekedésgátlásához szükséges VOR MIC értékek a szérumban elérhető VOR koncentráció alatt voltak. Az *in vitro* idő-ölés kísérletek során a VOR fungisztikusnak 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 $\times$ MIC; 0,25-0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) koncentrációkon gátolta. Ezek az idő-ölés eredmények a VOR gyenge *in vivo* hatására utalhatnak.

A POS *in vitro* viszonylag kisebb koncentrációkban szintén fungisztikus hatással bírt a *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* fajok ellen. Ehhez hasonló eredményeket figyeltünk meg a *C. parapsilosis sensu stricto* esetén is, ahol a magasabb, 32-64 $\times$ MIC koncentrációk ellenére sem alakult ki a fungicid hatás. A POS „*psilosis*” csoport okozta fertőzések terápiájában való alkalmazhatóságát *in vivo* is meg kell erősíteni, ennek azonban a szer korlátozott alkalmazhatósága szab határt, ugyanis jelenleg csak orálisan adagolható.

Az 5-FC MIC értékeket mindegyik tesztelt törzs esetében  $\leq 0,12 \mu\text{g/mL}$  koncentráción figyeltük meg, ez a szer alacsony koncentráción kiváló fungisztikus hatást eredményezett. Más antifungális szerrel kombinálva eredményes lehet a „*psilosis*” csoportba tartozó fajok fertőzései ellen.

A CAS koncentrációfüggő aktivitással jellemezhető. Az *in vivo* aktivitásukat jelentősen meghatározza az infekció helyén kialakult gyógyszerkoncentrációjuk.

A CAS általunk *in vitro* mért MIC értékei a *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* faj esetében alacsonyabbak voltak (0,12-0,5 µg/mL), mint a *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumoké (0,5-2 µg/mL).

Az echinocandinok esetében, a *C. parapsilosis sensu stricto* fajra a CLSI megtartotta a korábbi, 2 µg/mL érzékenységi határértéket. Első vonalbeli szereknek nem tekinthetők a *C. parapsilosis* által okozott fertőzésekben; CAS kezeléskor megfigyelhető áttörésszerű fertőzés és CAS rezisztencia kialakulása is. Ezenkívül szignifikáns korreláció is kimutatható a szer megnövekedett alkalmazás és a *C. parapsilosis sensu stricto* candidaemia nagyobb gyakorisága között.

A „*psilosis*” csoportba tartozó fajok elsődlegesen csökkent echinocandin érzékenységet azzal magyarázzák, hogy a glükán-szintetáz enzimük 660. prolin aminosavja helyén alanin található az *Fks1* „forró területének” 2. régiójában.

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. A 48 órás inkubálási időt követően csak egy *C. parapsilosis sensu stricto* és *C. orthopsilosis* faj esetében vált fungiciddé a gyógyszer.

A CAS terápia hatékonysága a FLU-hoz hasonlóan, kapcsolatban áll az AUC/MIC értékkel. Ez a CAS hosszú vesében való perzisztálásával és a hosszú, koncentrációfüggő posztantifungális hatásával magyarázható. 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.

A két újabban elkülönített fajjal szemben a CAS már 2 mg/kg napi adagban hatásos volt, ennek 50 mg/nap a megfelelő humán dózisa.

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. Az egerek 5 mg/kg/nap dózisának 70 mg/nap a megfelelő emberi dózisa

Az általunk vizsgált modellben a magas CAS dózis hatásosnak tűnt a *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumok esetén is. Ezért a faj által okozott fertőzések sikertelen empirikus CAS terápiájától nem feltétlenül kell tartani.

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 beteg az empirikus terápia során echinocandint kapott, akkor a páciens állapotának javulása esetén maradhatna az echinocandin terápia. A klinikailag instabil betegeknek egyértelműen az AMB ajánlható. Elgondolásunk helyességét további preklinikai illetve klinikai vizsgálatoknak kell megerősítenie.

## 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 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 mutatott.

Az átmenetileg neutropéniássá tett egerek esetén, a „*psilosis*” csoport tagjai ellen a napi 1 mg/kg amphotericin B, a 10 mg/kg és 20 mg/kg fluconazol szignifikáns hatású volt, azaz mindkét antifungális szer hatékonynak bizonyult. Bár a „*psilosis*” csoport tagjai kevésbé számítanak érzékenynek az echinocandinok ellen, a napi 5 mg/kg caspofungin adagolás hatékony volt.

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

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

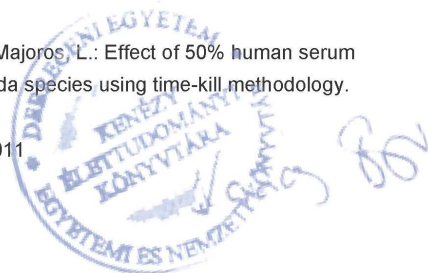
### További Közlemények

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: (értékelés alapjául szolgáló közlemények esetén): 4.267**

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

Debrecen, 2012.10.26



### ***Fontosabb előadások listája***

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

**J. Szilágyi**, S. Bayegan, R. Gesztelyi, G. Kardos, Á. Kemény-Beke, Z. Szabó, L. Majoros, *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.

### ***Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek listája***

S. Bayegan, **J. Szilágyi**, R. Gesztelyi, G. Kardos, J. Mózes, Á. Kemény-Beke, Zs. Szabó, R. Kovács, L. Majoros. 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.

L. Majoros, **J. Szilágyi**, S. Bayegan, A. Tavanti, Á. Kemény-Beke, G. Kardos, A. Adnan, R. Gesztelyi. *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.

L. Majoros, R. Kovács, R. Berényi, **J. Szilágyi**, R. Földi, R. Gesztelyi, G. Kardos, B. Juhász. *In vitro* and *vivo* efficacy of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*. 2nd Joint Workshop of ÖGMM, ÖGACH, ÖGIT & ÖGHMP, Vienna, 2011.