

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**CASPOFUNGIN *IN VITRO* ÉS *IN VIVO* HATÉKONYSÁGA *CANDIDA*
ALBICANS, *CANDIDA PARAPSILOSIS SENSU STRICTO*,
CANDIDA ORTHOPSILOSIS ÉS *CANDIDA METAPSILOSIS*
IZOLÁTUMOK ELLEN**

Dr. Berényi Réka

Témavezető: Dr. Majoros László



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2014

Tartalomjegyzék

FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK	4
BEVEZETÉS	5
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
ÁLTALÁNOS JELLEMZÉS.....	7
A FERTŐZÉS KIALAKULÁSÁHOZ HOZZÁJÁRULÓ TÉNYEZŐK	7
CANDIDA FAJOK ÁLTAL OKOZOTT MEGBETEGEDÉSEK EPIDEMIOLOGIÁJA	9
CANDIDA PARAPSILOSIS SENSU STRICTO, CANDIDA ORTHOPSILOSIS ÉS	
CANDIDA METAPSILOSIS	10
ECHINOCANDINOK.....	13
ECHINOCANDINOKKAL SZEMBENI REZISZTENCIA	18
CÉLKITŰZÉS	20
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	21
A FELHASZNÁLT GOMBAFAJOK EREDETE	21
IN VITRO ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLATOK	23
AZ IDŐ-ÖLÉS GÖRBÉK FELVÉTELE RPMI-1640+50% HUMÁN SZÉRUMBAN.....	23
IN VIVO VIZSGÁLATOK I.....	24
OLTÓANYAG KÉSZÍTÉS	25
FERTŐZÉS.....	25
ANTIFUNGÁLIS KEZELÉS.....	25
KVANTITATÍV CSÍRASZÁM MEGHATÁROZÁS.....	26
STATISZTIKAI ADATELEMZÉS	26
IN VIVO VIZSGÁLATOK II.	26
EREDMÉNYEK	28
AZ IN VITRO ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI	28
<i>Minimális gátló koncentráció eredményei RPMI-1640 közegben</i>	<i>28</i>
<i>Minimális gátló koncentráció eredményei RPMI-1640+50% szérum közegben.....</i>	<i>28</i>
<i>Az idő-ölés kísérletek eredményei RPMI-1640+50% szérum közegben</i>	<i>30</i>
AZ IN VIVO ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI I.....	34
<i>Caspofungin in vivo hatékonysága C. albicans ellen.....</i>	<i>34</i>

<i>Caspofungin in vivo hatékonysága C. parapsilosis sensu stricto ellen.....</i>	35
<i>Caspofungin in vivo hatékonysága C. orthopsilosis ellen.....</i>	37
<i>Caspofungin in vivo hatékonysága C. metapsilosis ellen.....</i>	39
AZ IN VIVO ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI II.	41
<i>Kezdő csíraszám a kezelés megkezdésekor.....</i>	41
<i>Caspofungin in vivo hatékonysága C. albicans ellen.....</i>	42
<i>Caspofungin in vivo hatékonysága C. parapsilosis sensu stricto ellen.....</i>	44
<i>Caspofungin in vivo hatékonysága C. orthopsilosis ellen.....</i>	46
<i>Caspofungin in vivo hatékonysága C. metapsilosis ellen.....</i>	47
A KÍSÉRLETI MUNKÁBAN RÉSZTVEVŐ TÁRSSZERZŐK MUNKÁJÁNAK ISMERTETÉSE	49
MEGBESZÉLÉS	50
ÖSSZEFOGLALÁS	59
SUMMARY	61
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	62
IRODALOMJEGYZÉK	63
TÁRGYSZAVAK/ KEYWORDS.....	76
FÜGGELÉK.....	79
FONTOSABB ELŐADÁSOK, POSZTEREK.....	79
KIEGÉSZÍTŐ TÁBLÁZATOK 1/A	81
KIEGÉSZÍTŐ TÁBLÁZATOK 1/B	82

Fontosabb rövidítések

ALS: agglutinin like sequence

AUC/MIC: koncentráció görbe alatti terület/MIC

AUC: area under the curve – koncentráció görbe alatti terület

CFU: Colony Forming Unit –telepképző egység

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

$C_{\max}$: a szérum maximális gyógyszerkoncentrációja

$C_{\min}$: a szérum minimális gyógyszerkoncentrációja

MIC: minimális gátlási koncentráció

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SAP: szekretált aszpartil proteináz enzimek

Bevezetés

Körülbelül 80 ezer gombafajt ismerünk, de ezek közül klinikailag kevesebb, mint 400 jelentős és 50-nél is kevesebb faj okozza az emberi és állati gombás megbetegedések 90%-át (Jawetz és mtsai. 2004). A gombafertőzések klinikai fontosságát a múlt század második felében ismerték fel, ami szoros kapcsolatban állt az invazív diagnosztikus és terápiás eszközök széleskörű elterjedésével (Naglik és mtsai. 2003). A *Candida* fajok a normál flóra komponensei, megtalálhatók a bélcsatornában, de a száj és hüvely nyálkahártyáján is (Bennett 2006). Ha a normál flóra egyensúlya felborul, vagy az immunrendszer legyengül, a *Candida* fajok gyakran válnak patogénné (Naglik és mtsai. 2003). A *Candida* fajokat a véráramfertőzések negyedik leggyakoribb nozokomiális kórozójaként tartják számon az (általános) kórházi betegpopulációban (Bennett 2006). A leggyakrabban izolálható faj még mindig a *C. albicans*, amit a *C. glabrata*, a *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* és a *C. krusei* követnek (Glöckner és mtsai. 2008, Eksi és mtsai. 2013, Pfaller és mtsai. 2012 oct., Papon és mtsai 2013, Pfaller és mtsai. 2010, Pfaller és Diekema 2007, Odds és mtsai 2007).

Az utóbbi két évtizedben megnövekedett a nem-*C. albicans* fajok okozta fertőzések száma (Horn és mtsai. 2009, Shorr és mtsai. 2011). Nemcsak a *C. glabrata*, a *C. parapsilosis* és a *C. tropicalis* hanem korábban, nagyon ritka humán patogénnek tartott fajok okoztak egyre nagyobb számban fertőzéseket. Pfaller és Diekema (2007) az ARTEMIS Surveillance Program segítségével kimutatták, hogy az olyan ritka fajok izolálása, mint a *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. rugosa* és *C. famata* 2-10-szeresére növekedett a vizsgált időszakban.

A *C. parapsilosis sensu lato* a világ több régiójában súlyos nozokomiális fertőzést okoz és sokszor a második leggyakrabban izolált véráram fertőzést okozó *Candida* faj, különösen Dél-Amerikában és Európa déli országaiban (Barchiesi és mtsai. 2007; Lochart és mtsai. 2008). Korábban a *C. parapsilosis* izolátumokat három genetikailag eltérő csoportba sorolták (I, II és III) (Tavanti és mtsai. 2005; Spreghini és mtsai. 2012 máj.). Tavanti és munkatársainak (2005) a vizsgálatai alapján a *C. parapsilosis sensu lato* három genotípusa három különböző fajt takar; a *C. parapsilosis sensu stricto* (korábbi I. genotípus), a *C. orthopsilosis* (korábbi II. genotípus), és a *C. metapsilosis* (korábbi III. genotípus) (Tavanti és mtsai. 2005).

A három genetikailag közel álló faj pontos elkülönítésére több kéziratot találunk az irodalomban (Prandini és mtsai. 2013, Németh és mtsai. 2013, Trofa és mtsai. 2008, Kocsubé és mtsai 2007, Spreghini és mtsai. 2012 máj., Tavanti és mtsai 2007). Első kéziratunk benyújtása idején (2012 máj.) azonban, gyakorlatilag semmilyen információ nem állt rendelkezésre a nemzetközi irodalomban a „psilosis” komplex mindhárom tagja ellen alkalmazható antifungális szerek *in vivo* hatékonyságára vonatkozóan, leszámítva egy másik, éppen bírálat alatt lévő kéziratunkat (Szilágyi és mtsai. 2012 feb.).

In vitro adatokból azonban ismert volt, hogy a „psilosis” csoport egyes tagjai különböznek egymástól az antifungális szerek iránti érzékenységet illetően. A *C. parapsilosis sensu stricto* echinocandinok iránti MIC értékei magasabbak, míg a fluconazol iránti MIC értékei alacsonyabbak voltak, mint a csoport két másik tagjának (García-Agudo és mtsai. 2012, Prandini és mtsai 2013, Lockhart és mtsai. 2008, Gomez-Lopez és mtsai. 2008, van Asbeck és mtsai. 2008, Szabó és mtsai. 2009). Mivel a *C. parapsilosis sensu lato* egyes térségekben a második leggyakoribb nosokomiális kórokozó a gombák között, ezért az optimális terápia tervezéséhez munkacsoportunk állatkísérletekkel próbált hozzájárulni.

Irodalmi áttekintés

Általános jellemzés

Minden gomba eukarióta élőlény, a legtöbb obligát, vagy fakultatív aerob (Jawetz és mtsai. 2004). Mikroszkópos megjelenésük alapján a gombákat sarjadzó (élesztő) és fonalas (penész) gombákra, illetve a környezeti körülményektől függően, mindkét formát felvenni képes dimorf gombákra osztjuk (Pál Tibor 2012).

A különböző gombafajok három fő formában nőhetnek: élesztő, pszeudohifa és hifa. A sarjadzó gombák általában egysejtű, ovális képletek, átmérőjük 3-15 μm között változik (Jawetz és mtsai. 2004; Thompson és mtsai. 2011). A pszeudohifa és a hifa hengeres képletek, a pszeudohifák sejthalakja ellipszis, a sejtek nem válnak el teljesen, valódi szeptumokkal nem rendelkeznek. A valódi hifák sejtfalai egymással párhuzamos lefutásúak és a sejteikben valódi szeptumok találhatók (Thompson és mtsai. 2011).

Az összes gomba rendelkezik egy alapvetően merev sejtfallal, amely meghatározza az alakjukat (Jawetz és mtsai. 2004). A sejtfal főleg szénhidrát rétegekből, ami hosszú poliszacharid láncokat jelent, valamint glikoproteinekből és lipidekből épül fel (Jawetz és mtsai. 2004). Ennek a struktúrának a belső rétege főleg β -1,3- és β -1,6- glükánt, kitint tartalmaz, míg a külső rétegében mannoprotein, mannán található (Grubb és mtsai. 2008). Ezen kívül a gombák jellemző tulajdonsága, hogy a membránjuk szterol komponense ergoszterol (Gergely Lajos 2003).

A fertőzés kialakulásához hozzájáruló tényezők

Az invazív fertőzés kialakulásához hozzájárul a normál baktérium flóra elpusztítása antibiotikum terápia során, a bőr normál védőrétegének megszakítása, (például intravénás katéterrel) vagy a gyomor- bél- nyálkahártya károsodása (beleértve a kemoterápia indukált mucositist, a műtétet vagy a perforációt) (Bennett és mtsai. 2006).

A gombák, a baktériumokhoz hasonlóan számos virulencia faktorral rendelkeznek, amelyek segítik a kórokozó megtapadását, majd a normálisan steril helyekre való bejutásukat.

Bár sok *Candida* faj élesztő és pseudohifa formát is képes alkotni, csak három faj az, amelyek filogenetikailag hasonlóak (*C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. albicans*), és hifát is tudnak képezni (Thompson és mtsai. 2011). *C. albicans* esetén jellemző, hogy ha az élesztő forma kapcsolatba lép az epithel sejtekkel, később átvált a hifa formában történő növekedésre (Zakikhany és mtsai. 2008).

A *Candida* fertőzések szoros kapcsolatot mutatnak a felszínen való biofilm képződésével, így hozzájárul a fertőzés kialakulásához mind a nyálkahártyán, mind szisztémásan (Mishra és mtsai. 2007). Ez a felület lehet intravaszkuláris katéter, de lehet peritoneális dialízis katéter, ventriculo-peritoneális shunt és sok más olyan implantátum, amelyek segítik a beteg életben maradását és javítják életminőségét (De Luca és mtsai. 2012). A biofilm, a felszínen összekapcsolódott mikroorganizmusok összetett, egymástól függő egysége glikoprotein matrixba ágyazva (Mishra és mtsai. 2007). A biofilmnek klinikailag fontos jellegzetessége, hogy megnöveli az antifungális készítmények elleni rezisztenciát (Melo és mtsai. 2007).

A *Candida* fajoknál jól ismert a szekretált aszpartil proteináz enzimek (SAP) szerepe a patogenezisben (Mishra és mtsai. 2007). A szövetek károsodásában, a bőr epidermiszének és a száj epithéliumának fertőzésében működnek közre a SAP1, SAP2 és a SAP3 enzimek. Szisztémás fertőzéseknél van a legfőbb szerepük a SAP4, SAP5 és SAP6 enzimeknek, melyek kifejeződhetnek a sejt-hifa átalakulás közben (Naglik és mtsai. 1999, Nantel és mtsai. 2002). Az adhézióban van jelentőségük a SAP9 és a SAP10 fehérjének, segítik a sejtek szétválását, valamint a felszíni integritás fenntartásában is szerepet kapnak (Albrecht és mtsai. 2006).

Az enzimek egy heterogén csoportjába tartoznak a „foszfolipázok”, amelyeknek fontos szerepe van az invazív candidiasis kialakításában (Ghannoum és mtsai. 2000). A foszfolipáz A, B és C kimutatható *C. albicans* esetén, amelyek hozzájárulnak a célsejt membrán károsításához, hozzátapadásához és a célsejtbe való bejutáshoz (Mishra és mtsai. 2007).

Az ALS (agglutinin like sequence) fehérjék kulcsfontosságú szerepet játszanak véráramból való kijutásban, a szövetekben való megtelepedésben és a biofilm képzésben (Thompson és mtsai. 2011, Liu és mtsai. 2011). Az ALS család nyolc taggal rendelkezik (ALS1-től ALS7-ig

és ALS9). A legtöbb ALS fehérje adhezív funkcióval bír, így az ALS3 kulcsfontosságú szerepet játszik a biofilmképzésben (Liu és mtsai. 2011) .

A *C. albicans* esetén, a SOD5 gén kódolja a szuperoxid dizmutázt, ami a hifa növekedése alatt indukálódik és védelmet nyújt az oxidatív stressz ellen (Thompson és mtsai. 2011).

***Candida* fajok által okozott megbetegedések epidemiológiája**

Az invazív *Candida* fertőzések gyakorisága drámaian megnövekedett az utolsó 2-3 évtizedben és ez a tendencia folytatódik a 21. században (Naglik és mtsai. 2003). A bakteriális fertőzések eredményesebb kezelése, de a továbbra is fennálló rizikófaktorok (neutropénia, túl magas vagy túl alacsony életkor, súlyos műtéti beavatkozások, a centrális, vagy perifériás katéterek használata, vagy a kemoterápia indukált mucositis) miatt a steril testtájakból izolált sarjadzó gombafertőzések száma folyamatosan növekszik (Horn és mtsai. 2009). Korábban a *C. albicans* akár 70-80%-os gyakorisággal volt izolálható invazív fertőzésekből, de 1991-től kezdve (ekkor vezették be a fluconazolt a terápiás ellátásba) a nem-*albicans Candida* fajok erőteljes előtörése kezdődött (Lewis 2011).

Horn és munkatársai (2009) 2019 candidemiában szenvedő beteg esetén 45,6%-ban mutattak ki *C. albicans*-t, 26%-ban *C. glabrata*-t, 15,7%-ban *C. parapsilosis*-t, 8,1%-ban *C. tropicalis*-t és 2,5%-ban *C. krusei*-t. Kissé eltérő izolálási gyakoriságot kaptak Axner-Elings és munkatársai (2011) svédországi vizsgálataik során (*C. albicans* és a *C. glabrata* 34-34%, *C. parapsilosis* 15,1%, *C. dubliniensis* 5,9%, a *C. tropicalis* és a *C. lusitaniae* 3,4-3,4%, *C. krusei* 2,1%).

A *Candida* fajok által okozott véráramfertőzések epidemiológiáját földrajzi elhelyezkedés szerint Pfaller és munkatársai (2008) 5346 izolátum esetén vizsgálták. A véráramfertőzések több mint 50%-ért Európában (58,42%) és Ázsiában (57,1%) a *C. albicans* felelős, Dél-Amerikában csak az izolátumok 47,9%-a, míg Észak-Amerikában az izolátumok 50%-a volt *C. albicans*. A *C. parapsilosis* és *C. tropicalis* hasonlóképpen kiemelkedő Ázsia és Dél-Amerika területein, de Európában és Észak-Amerikában kevésbé jelentősek. A *C. albicans* után a leggyakoribb faj a *C. glabrata* Észak-Amerikában és Európában, de Dél-Amerikában és Ázsiában kevésbé gyakori. A *C. krusei* relatíve gyakori Európában ($\leq 5\%$) (Pfaller és munkatársai 2008 aug.).

Ugyancsak Pfaller és munkatársai (2012 dec.) figyelték meg, hogy a *C. albicans* izolátumok előfordulási gyakorisága eltérő a különböző kórházi osztályokon. A *C. albicans* 42,1%-ban volt izolálható az összes izolátumot tekintve. A *C. albicans* által okozott fertőzések kiemelkedőek az újszülött intenzív osztályokon (54,8%) és a sebészeti osztályokon (44,5%), a legritkább azonban a hematopoeticus őssejt transzplantáción átesettek körében (17,6%).

C. glabrata volt a második leggyakrabban előforduló faj (26,7%). A *C. glabrata* által okozott candidemia általában az idősekben jelenik meg, főleg azokban, akik előzőleg antifungális terápiában részesültek (51,9%), szervátültetettekben (38,4%), hematopoetikus őssejt transzplantáltakban (32,7%). Újszülött intenzív osztályon viszont rendkívül ritka (1,6%) (Pfaller és mtsai. 2012 dec.). Általában a halálozási arány magasabb, mint 40% (Howard és mtsai. 2011) és csökkent érzékenységet mutatnak azolok iránt, főként fluconazol alkalmazásakor (Spreghini és mtsai. 2012 márc.).

A *C. tropicalis*, az összes candidaemiát okozó faj csupán 8,7%-át jelentette a tanulmányban, és főleg hematológiai osztályokról származó betegeknél izolálták (15,4%), de nem izolálták újszülött intenzív osztályon. Az ötödik leggyakrabban izolált faj a *C. krusei* volt, az összes izolátum 3,4%-a. Az általa okozott fertőzések általában gyakoriak neutropéniában szenvedőknél (51,3%), hematopoetikus őssejt átültetettekben (19,4%), és egyéb hematológiai problémákkal küszködő betegeknél (16%). A *C. krusei* fertőzésben szenvedő betegek 79,6%-a korábban már részesült antifungális terápiában (Pfaller és mtsai. 2012 dec.). Az invazív *C. krusei* fertőzések kezelése nehézkes, ami az intrinzik fluconazol rezisztenciának köszönhető, valamint a csökkent érzékenységnek amphotericin B és flucitozin iránt (Cantón és mtsai. 2009).

Candida parapsilosis sensu stricto, Candida orthopsilosis és Candida metapsilosis

Mint említettem, napjainkban a véráramfertőzések nagy hányada a nem-albicans *Candida* fajoknak köszönhető, többek között a *C. parapsilosis*-nak. Ez a második leggyakrabban izolálható *Candida* faj Ázsiában, Dél-Amerikában és néhány Európai országban is a véráram *Candida* fajok okozta fertőzései esetén. Előfordulási gyakorisága a gyermekgyógyászati osztályokon egyre nagyobb (Cantón és mtsai. 2011).

Molekuláris biológiai módszerekkel a széles értelemben vett *C. parapsilosis* három csoportját ma már három különböző fajra osztjuk; *C. parapsilosis sensu stricto* (I. csoport), *C. orthopsilosis* (II. csoport) *C. metapsilosis* (III. csoport). Számos tanulmányban kimutatták, hogy a három faj virulenciája eltérő és különböző érzékenységgel rendelkeznek az antifungális szerek iránt (Németh és mtsai. 2013, Prandini és mtsai. 2013, Orsi és mtsai. 2010, Gomez-Lopez és mtsai. 2008). A két újonnan elkülönített faj előfordulási gyakorisága *C. orthopsilosis* esetén 2,3%-tól 9%-ig, míg *C. metapsilosis* esetén 0,9%-tól 6,9%-ig terjed, de ezek a százalékok függenek az országtól, és a klinikai minta típusától is (Garcia-Effron és mtsai. 2012).

A *C. parapsilosis* gyakori, bőrön található szaprofita, az egészségügyben dolgozók a tenyerükön és a körmük alatt tünetmentesen hordozzák (Cantón és mtsai. 2011). Kitűnő biofilm képző tulajdonságuk miatt gyakran kapcsolódnak katéterhez, vagy intravénás táplálás során alkalmazott eszközökhöz, katéter-asszociált invazív fertőzést okozva (Cantón és mtsai. 2011). A *C. orthopsilosis*-t ascitesből, tályogokból, katéterekről, agy- gerincvelői folyadékból, köpetből illetve hörgőből izolálták. A *C. metapsilosis* szintén izolálható tályogokból, ascitesből, hörgőből és ízületi folyadékból (Lochart és mtsai. 2008).

A legnagyobb százalékban izolálnak *C. orthopsilosis*-t Ázsiában (11%), azután Dél-Amerikában (10,9%). Észak-Amerikában 5%-ban izolálnak *C. orthopsilosis*-t a „psilosis” komplex tagjai közül, azon belül az Amerikai Egyesült Államokban fordul elő a legmagasabb arányban (4,9%), miközben ez a szám Mexikóban 10,7% volt. A Kanadában vizsgált 52 izolátum közül egyik sem volt *C. orthopsilosis*. Egész Európában és Közel-Keleten 17 *C. orthopsilosis*-t (3,5%) izoláltak, ezeknek az izolátumoknak több mint a fele Olaszországból származott, ahol az izolátumok 8% *C. orthopsilosis*. Finnországban, az Egyesült Királyságban, Lengyelországban, Portugáliában, Oroszországban, Magyarországon és Izraelben nem izoláltak *C. orthopsilosis*-t. A *C. metapsilosis* úgy, mint a *C. orthopsilosis* megtalálható mind a hat földrészen. Észak-Amerikában 646 izolátumból csak 4 (0,6%), míg Dél-Amerikában 146 izolátumból 1 (0,7%) volt *C. metapsilosis*. Két *C. metapsilosis* izolátum volt Kanadában és Európában, körülbelül ugyanannyi *C. metapsilosis*-t (14 izolátum; 2,9%) izoláltak, mint amennyi *C. orthopsilosis*-t. A *C. metapsilosis*-t legmagasabb százalékban (13,8%) Lengyelországban izoláltak, valamint Spanyolországban, Törökországban, Portugáliában és Olaszországban találtak még *C. metapsilosis*-t. Ausztráliában több *C. metapsilosis* fajt izoláltak, mint *C. orthopsilosis*-t. Az összes ázsiai izolátum 2,6%-a volt *C.*

metapsilosis. Dél-Amerikából származó nagyszámú izolátumokból csak 1,7% volt *C. metapsilosis* (Lockhart és mtsai. 2008). (Az itt látható adatok a Kiegészítő táblázat 1/A részében vannak összefoglalva.)

Cantón és munkatársai (2011) 34,6%-ban figyeltek meg *C. parapsilosis sensu lato* okozta fungémiát az intenzív osztályokon, de molekuláris biológiai módszerekkel egyik sem bizonyult *C. orthopsilosis*-nak vagy *C. metapsilosis*-nak. A *C. parapsilosis sensu stricto* leggyakrabban az intenzív osztályon (28,8%), sebészetben (20,9%), belgyógyászatban (19,7%), újszülött osztályon (7%) és a gyermekgyógyászatban (6,7%) fordult elő.

Garcia-Effron és munkatársai (2012) 293 *C. parapsilosis sensu lato* izolátumot azonosítottak 287 betegből (179 férfi és 108 nő). A tanulmányban a betegek átlag életkora *C. parapsilosis sensu stricto* esetén 41 év, *C. orthopsilosis* esetén 50 év, míg *C. metapsilosis* esetén 63 év volt. Az adatok alapján a fajok előfordulási gyakoriságát, hasonlóan a *C. glabrata* előfordulási gyakoriságához, az életkor is befolyásolja (Lockhart és mtsai. 2008, Flevary és mtsai. 2013).

A „psilosis” csoport jobb jellemzése érdekében, fontos tudni, hogy nem csak epidemiológiai, de antifungális szerek iránti érzékenyséjük is megkülönbözteti a csoport tagjait egymástól. (Gomez-Lopez és mtsai. 2008). Ez azért is fontos, mert a csoport mindhárom tagjában megtalálható az a mutáció (lásd később), amely alapján a csoport tagjai ellen a leghatékosabb körben használatos echinocandinok hatékonysága megkérdőjelezhető (Pfaffer és mtsai. 2012 jan.).

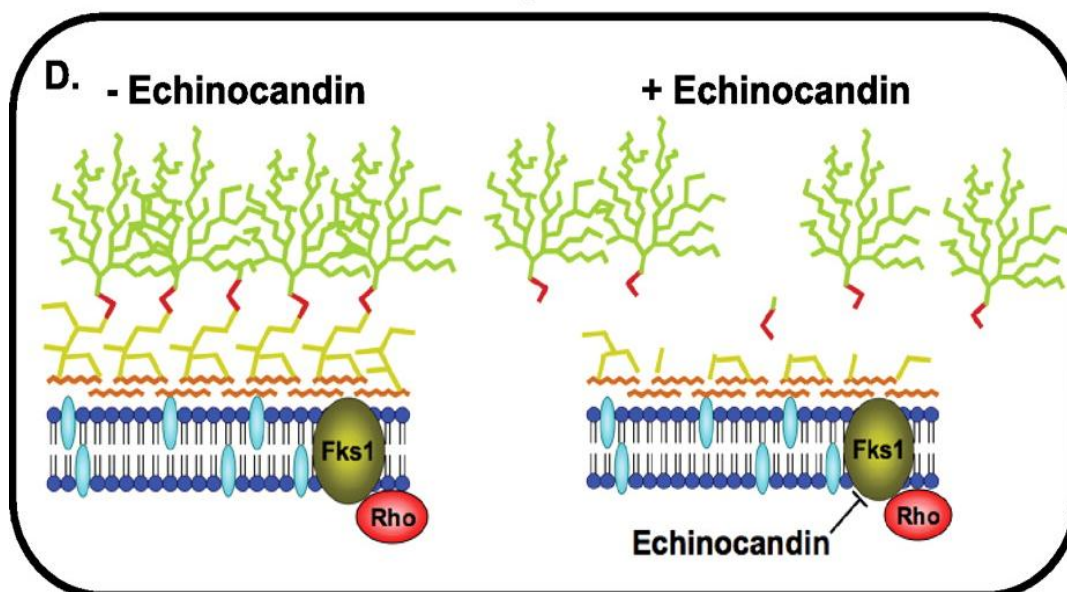
A *C. parapsilosis* echinocandinokkal szembeni MIC értékei magasabbak, mint a *C. orthopsilosis* vagy a *C. metapsilosis* izolátumokkal szemben. A *C. parapsilosis* MIC₉₀ értékei caspofungin, anidulafungin és micafungin esetén 1 mg/l, 2 mg/l és 2 mg/l. *C. orthopsilosis* MIC₉₀ értékei caspofungin, anidulafungin és micafungin szerekkel szemben 0,25 mg/l, 2 mg/l és 0,5 mg/l. A MIC₉₀ értékek legalacsonyabbak a *C. metapsilosis* esetén voltak, caspofungin 0,25 mg/l, anidulafungin 1 mg/l és micafungin 0,5 mg/l (Lockhart és mtsai. 2008).

Cantón és munkatársai (2010) *in vitro* az anidulafungin, caspofungin és micafungin ölési aktivitását vizsgálták a „psilosis” csoport tagjai ellen. A három echinocandin aktivitása faj- és gyógyszerfüggő volt. Az anidulafungin mutatta a legjobb fungicid aktivitást *C. metapsilosis* és *C. orthopsilosis*-al szemben, míg a micafungin *C. parapsilosis* esetén. Csökkent ölést és újra növekedést figyeltek meg 6 órával a kísérlet megkezdése után *C. parapsilosis* esetén, mind a három szerrel szemben. Az ölés minden faj és gyógyszer kombinációnál elkezdődött a

MIC értékeken. A maximális ölési ráta *C. orthopsilosis* esetén 4 mg/l volt mindhárom echinocandin esetén. *C. metapsilosis* esetén a maximális ölési ráta anidulafungin esetén 1 mg/l, míg a micafungin és a caspofungin esetén 16 mg/l voltak. Az ölési ráták a legmagasabb koncentrációkon a *C. parapsilosis*-nál voltak megfigyelhetők; caspofungin esetén 16 mg/l volt, micafunginnal szemben 32 mg/l míg anidulafungin esetén 8 mg/l voltak (Cantón és mtsai. 2010). Ezek az adatok megerősítik, hogy a három faj közül *in vitro* a *C. parapsilosis sensu stricto* a legkevésbé érzékeny az echinocandinok iránt (Barchiesi és mtsai. 2006, Cantón és mtsai. 2010, Varga és mtsai. 2008, van Asbeck és mtsai. 2008).

Echinocandinok

Az echinocandinok az antifungális szerek legújabb csoportja, amelyekhez nagy reményeket fűztek az invazív *Candida* fertőzések kezelésére. Az echinocandinok jelenleg első élvonalbeli szerek disszeminált candidiasis kezelésében. Az echinocandinok kémiai szerkezetére jellemző N- kapcsolt acil zsírsav oldallánc a ciklikus hexapeptiden, ami meghatározza az aktivitásukat (Chen és mtsai. 2011; Glöckner és mtsai. 2008). A caspofungin volt az első, amelyet a micafungin, majd az anidulafungin követett (Bormann és mtsai. 2009; Bal 2009). Az echinocandinok nagy molekulatömegű (kb. 1200 kDa) szemisztetikus lipopeptidek, amelyeket különböző gombákból állítanak elő. A caspofungint a *Glarea lozoyensis* által termelt pneumocandin B-ből, az anidulafungint az *Aspergillus nidulans* echinocandin B₀ termékéből, míg a micafungint a *Coleophoma empedri* hexapaptidjéből állítják elő (Chen és mtsai. 2011, Bormann és mtsai. 2009).



1. ábra: Echinocandinok hatása a sejtfa1 szintézisre (Cowen és Steinbach, 2008)

Az echinocandinok az 1,3-β-D-glükán szintetáz nem kompetitív inhibítorai, ami a gomba sejtfa1 esszenciális alkotórésze (Bennett és mtsai. 2006; Glöckner és mtsai. 2008). Az emlős sejt nem tartalmaz 1,3-β-D-glükánt, ezért az echinocandinok hatása szelektív a gombák ellen (Letscher-Bru és mtsai. 2003, Chen és mtsai. 2011). A gomba sejtfa1ban található enzimkomplex két alegységből áll: Rho1p és Fks1p. Az előbbi szabályozó feladattal rendelkezik (Pfaller és mtsai. 2011). Az Fks1p enzimet kódolják az FKS1, FKS2 és FKS3 gének (Bal 2010). Az echinocandinok támadáspontja az FKS1 gén által létrehozott Fks1p, ami az enzim aktív helye. Az 1,3-β-D-glükán szintézis gátlása szaporodás gátlást vagy a gomba pusztulását okozza. A fungisztatikus hatás a sejtfa1szintézis gátlását eredményezi, csökkentve a gomba növekedését. A fungicid hatás következménye, hogy a sejtfa1 integritása megváltozik, ezáltal a sejt elveszti a mechanikai szilárdságát, amelynek következtében képtelen lesz ellenállni az intracelluláris ozmotikus nyomásnak, így a gombasejt pusztulásához vezet (Letscher-Bru és mtsai. 2003, Chen és mtsai. 2011, Glöckner és mtsai. 2008). A gyógyszerkoncentráció emelése a fungisztatikus hatást fungiciddé változtathatja. Az echinocandinok széles terápiás tartománnyal rendelkeznek, a klinikailag fontos kérdés azonban az, hogy az Fks1 mutáns kezelhető-e a megszokott, vagy emelt dózisú gyógyszerrel (Slater és mtsai. 2011).

Az echinocandinok antifungális spektruma megegyezik, beleértve a klinikailag fontos *Candida* és *Aspergillus* fajokat (Glöckner és mtsai. 2008). A *Cryptococcus neoformans* és a *Trichosporon* fajok természetes rezisztenciával rendelkeznek echinocandinok iránt (Bennett 2006).

Pfaller és munkatársai (2008 aug.) eredményei alapján az 5346 klinikai izolátum 99,9%-át a caspofungin ≤ 2 mg/l koncentrációja gátolta. A caspofungin MIC₉₀ értéke *C. krusei* (0,25 mg/l), *C. parapsilosis* (1 mg/l) és *C. guilliermondii* (1 mg/l) esetén magasabbak voltak a három leggyakrabban előforduló faj MIC₉₀ értékénél; *C. albicans* (0,06 mg/l), *C. glabrata* (0,06 mg/l) és *C. tropicalis* (0,06 mg/l). Hasonló eredményt kaptak Bormann és munkatársai (2009) is, akik véráramfertőzésből izolált 2000 *Candida* izolátum MIC értékeit határozták meg micafungin iránt.

Az echinocandinok MIC₉₀ értékei a „*psilosis*” csoport tagjai ellen magasabbak tehát, mint a másik négy leggyakrabban előforduló fajt (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* és *C. krusei*) (Gracia-Agudo és mtsai. 2012, Eksi és mtsai. 2013, Pfaller és mtsai. 2008 aug., Axner-Elings és mtsai. 2011, Perlin 2007). Az echinocandinok iránti csökkent érzékenység oka ma már ismert. A „*psilosis*” csoport mindhárom tagja esetén a glükán-szintetáz enzimjének Fks1 alegységében a 660-adik aminosav esetén a prolint alanin helyettesíti (Garcia-Effron és mtsai. 2008). *C. orthopsilosis* esetén a „második forró területen” izoleucin-valin csere is megfigyelhető, (Chen és mtsai. 2011, Garcia-Effron és mtsai. 2008), aminek jelentősége jelenleg nem ismert.

A farmakokinetikai és farmakodinámiai paraméterek leírására AUC/MIC (a görbe alatti terület és a MIC aránya), C_{max}/MIC (a csúcskoncentráció aránya a MIC értékhez viszonyítva), T_{MIC} (az az időtartam, amíg a koncentráció a MIC érték fölött marad) értékei szolgálnak (Goodwin és Drew 2008, Gumbo 2007). A terápia során megcélozni kívánt farmakokinetikai és farmakodinámiai értékek határozzák meg azt, hogy egyszeri nagy dózis vagy többszöri kisebb dózis a célravezető adagolási mód. Ha a C_{max}/MIC vagy az AUC/MIC érték a fontos, akkor a ritkábban adagolt, nagy dózis az ajánlott, ha pedig a T_{MIC}, akkor pedig a többszöri, kis dózis növeli a terápia hatékonyságát (Gumbo 2007).

Az echinocandinok rosszul szívódnak fel orálisan, ezért intravénás alkalmazásuk szükséges (Bennett 2006), és napi egyszeri adagolás ajánlott (Chen és mtsai. 2011; Glöckner és mtsai. 2008). A kezelés anidulafungin és caspofungin esetében egy telítő dózissal kezdődik, ami 200

mg anidulafungin és 70 mg caspofungin. Ezt követik a fenntartó dózisok, ami 100 mg/ nap anidulafungin és 50 mg/ nap caspofungin esetén. Micafunginnál napi 100 mg-os adagolást állapítottak meg (Glöckner és mtsai. 2008; Bennett 2006).

A mellékhatások ritkák, kevés gyógyszer esetében volt megfigyelhető interakció és biztonságosan alkalmazhatók, azoknál a betegeknél, akik vese- vagy májműködési zavarban szenvednek. Meningitis vagy endophtalmitis kezelésére egyik echinocandin sem alkalmas (Bal 2010, Bennett 2006, Howard és mtsai. 2011).

Az anidulafungin lineáris farmakokinetikát mutat. A biotranszformációja lassú, kiválasztódik az epehólyagban anélkül, hogy metabolizálna a májban, majd a vizelettel és a széklettel ürül. Hasonlóan az anidulafunginhoz, a micafungin is lineáris farmakokinetikát mutat, lebontására pedig a májban kerül sor, ugyanúgy, mint a caspofungin alkalmazásakor. A caspofungin nem rendelkezik lineáris farmakokinetikával. Caspofungin nem dializálható (Bal 2010; Glöckner és mtsai. 2008). Az echinocandinok eltérő félélet időt mutatnak, amely az anidulafungin esetében 26,5 óra, micafungin 15-17 óra és caspofunginnál 9-11 óra. A szövetekben való eloszlás kulcsfontosságú momentuma az echinocandinok farmakokinetikájának, ami az anidulafungin esetében 0,6 l/kg és a caspofungin esetében 0,15 l/kg (Glöckner és mtsai. 2008).

Stone és munkatársai (2002) a telítő dózis fontosságát vizsgálták. A 70 mg telítő dózist 50 mg fenntartó dózis követte naponta az egyik esetben, míg a másik esetben 50 mg napi dózist adagoltak. A cél az 1 mg/l-es koncentráció elérése és fenntartása volt. Telítő dózis alkalmazásával már az első nap elérték a célkoncentrációt, míg a napi 50 mg-os dózis adagolásánál csak a második nap után sikerült (Stone és mtsai. 2002).

A caspofungint naponta egyszer intravénásan adagolják (Bennett 2006, Chen és mtsai. 2011, Glöckner és mtsai. 2008). Louie és munkatársai (2005) vizsgálatai alapján AUC/MIC érték az a farmakodinámiai paraméter, amelyet a caspofungin klinikai hatékonyságával összefüggésbe hozhatunk. Vizsgálataik azt is kimutatták, hogy a caspofungin a belső szervekben, mint rezervoárookban felhalmozódik, majd onnan visszaáramlik a vérbe.

2007-ben a CLSI által összegyűjtött klinikai és mikrobiológiai adatok alapján az echinocandin MIC határértékeket a különböző *Candida* fajokkal szemben egységesen ≤ 2 mg/l értékben határozták meg (CLSI 2008, Pfaller és mtsai. 2008 aug.), azaz minden izolátum, amelynek MIC értéke nem volt nagyobb, mint 2 mg/l, érzékenynek kellett tekinteni. Ebben a

határértékben egyértelműen tükröződött, hogy abban az időben rezisztens izolátummal még nemigen lehetett találkozni. Később egyre gyakrabban lehetett olvasni a nemzetközi irodalomban, jól karakterizált, echinocandin rezisztens izolátumokról (Wiederhold és mtsai. 2011, Pfaller és mtsai. 2013, Shields és mtsai. 2013, Wiederhold és mtsai. 2008, Arendrup és mtsai. 2011). Ezek után nyilvánvalóvá vált, hogy nem lehet „egy kalap alá venni” az echinocandinok különböző *Candida* fajok iránti határértékeit. Pfaller és munkatársai (2012 jan.) javaslatára születtek meg a fajspecifikus határértékek (1. táblázat).

<i>Candida</i> faj	Antifungális szer	MIC (mg/l)		
		Érzékeny	Mérsékelten érzékeny	Rezisztens
<i>C. albicans</i>	Anidulafungin	≤0.25	0.5	≥1
	Caspofungin	≤0.25	0.5	≥1
	Micafungin	≤0.25	0.5	≥1
<i>C. glabrata</i>	Anidulafungin	≤0.12	0.25	≥0.5
	Caspofungin	≤0.12	0.25	≥0.5
	Micafungin	≤0.06	0.12	≥0.25
<i>C. tropicalis</i>	Anidulafungin	≤0.25	0.5	≥1
	Caspofungin	≤0.25	0.5	≥1
	Micafungin	≤0.25	0.5	≥1
<i>C. krusei</i>	Anidulafungin	≤0.25	0.5	≥1
	Caspofungin	≤0.25	0.5	≥1
	Micafungin	≤0.25	0.5	≥1
<i>C. parapsilosis</i>	Anidulafungin	≤2	4	≥8
	Caspofungin	≤2	4	≥8
	Micafungin	≤2	4	≥8
<i>C. guilliermondii</i>	Anidulafungin	≤2	4	≥8
	Caspofungin	≤2	4	≥8
	Micafungin	≤2	4	≥8

1. Táblázat: Fajspecifikus határértékek

Echinocandinokkal szembeni rezisztencia

Terápia során kialakuló echinocandin rezisztencia esetén a glükán-szintetáz enzim Fks1 alegységének az 1. és a 2. ún. „forró területein” („hot-spot” régiók) mutatható ki aminosav változás. Az első „forró terület” a 641-648 aminosav régióban, míg a második „forró terület” az 1345-1365 közötti aminosav régióban található. *C. albicans*, *C. tropicalis* és a *C. krusei* esetén az FKS1p alegységen történő aminosav cserével, míg *C. glabrata* esetén az Fks1p és Fks2p alegység aminosav cseréivel jön létre a rezisztencia. A „psilosis” csoport primer,

csökkent echinocandin érzékenységét már korábban említettem (Pfaller és mtsai. 2011, Slater és mtsai 2011, Perlin 2007, Garcia-Effron és mtsai. 2011, Pfaller és mtsai. 2012 jan.).

Az echinocandin rezisztencia még mindig ritkának számít (*C. albicans* (0,0-0,6%), *C. tropicalis* (0,0%), *C. parapsilosis* (0,0-1,2%) és *C. krusei* (0,0%). Detektálásuk azonban igazi kihívást jelent a klinikai mikrobiológiai laboratóriumok számára (Pfaller és mtsai. 2013).

Az echinocandinok nagymértékben kötődnek a fehérjékhez, ez caspofungin esetén 96%, micafunginnál 99,8% és anidulafunginnál 99%. Elméleti megfontolások alapján a nagymértékű fehérjekötődés miatt az echinocandinok aktivitása a különböző *Candida* fajok ellen csökkennie kell (Odabasi és mtsai. 2007; Paderu és mtsai. 2007).

Odabasi és munkatársai (2007) a fehérje kötés hatását vizsgálták caspofungin, anidulafungin és micafungin aktivitására *Candida* és *Aspergillus* fajok ellen. Humán szérum hozzáadásával élesen megemelkedett a micafungin és az anidulafungin MIC értéke, de csak mérsékelten befolyásolta a caspofungin MIC értékét. Spreghini és munkatársai (2012 Mar.) szérum nélkül és szérumban is vizsgálták a három echinocandin MIC értékeit *C. glabrata* izolátumok ellen. Szérum nélküli (RPMI-1640) tápközegben az anidulafungin, caspofungin és micafungin MIC értékei a következők voltak 0,10; 0,04; és 0,02 mg/l. Szérum jelenlétében a MIC értékek növekedést mutattak, 1,08; 0,32 és 0,62 mg/l. Az adatok világosan mutatják, hogy az echinocandinok aktivitása szérum jelenlétében csökkenni fog (Ishikawa és mtsai. 2009, Odabasi és mtsai. 2007, Paderu és mtsai. 2007)

Az antifungális érzékenységi vizsgálatokat RPMI-1640 alapú tesztközegben végezzük, míg az antifungális szerek fehérje alapú közegben (vér, szövetek) fejtik ki a hatásukat. A fehérje kötődés hatására a szabad echinocandin koncentráció csökken, azaz a vártnál jóval kevesebb gyógyszer jut a kórokozó gátlására, így terápiás sikertelenség következhet be (Spreghini és mtsai. 2012 máj., Garcia-Effron és mtsai. 2011, Odabasi és mtsai. 2007, Desnos-Ollivier és mtsai. 2008).

Az állati és humán szérum nemcsak abban tűnik fontosnak, hogy segítenek jobban megismerni az antifungális szerek valódi hatását, de adatok vannak arról is, hogy segíthetnek kimutatni azokat a rezisztens izolátumokat, amelyek echinocandin terápia során alakulnak ki (Jiménez-Ortigosa és mtsai. 2014, Garcia-Effron és mtsai. 2009, Szilágyi és mtsai. 2012 feb.).

Célkitűzés

A nemzetközi irodalomban ellentmondásos adatok álltak rendelkezésre az echinocandinok *in vivo* hatékonyságát illetően a *Candida parapsilosis sensu stricto* ellen, illetve a *Candida orthopsilosis* és a *Candida metapsilosis* fajok ellen adatok nem is álltak rendelkezésre.

Célul tűztük ki:

- a caspofungin *in vitro* hatékonyságának összehasonlítását a „psilosis” csoportba tartozó három faj esetén a standard RPMI-1640 illetve RPMI-1640 +50% humán szérum tesztközegekben vizsgáltuk, a minimális gátló koncentrációk és az idő-ölés görbék segítségével.
- terápiás alternatívát keresve neutropéniás egérmodellben összehasonlítottuk a caspofungin *in vivo* hatékonyságát naponta egyszer adagolt kisebb dózisok illetve egyszeri, nagydózissal kezelt állatokban (ugyanolyan összdózist alkalmazva)
- minden esetben, összehasonlításként, több caspofungin iránt érzékeny *Candida albicans* klinikai izolátumokat és egy caspofungin iránt rezisztens izolátumot is használtunk.

Anyagok és módszerek

A felhasznált gombafajok eredete

A kísérletekben alkalmazott izolátumokat, beleértve, hogy melyik testtájékról lettek izolálva az 2. táblázat tartalmazza. A magyarországi izolátumokat a Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézet Diagnosztikai Laboratóriumában azonosítottuk hagyományos módszerekkel (Bayegan és mtsai. 2011, Szilágyi és mtsai. 2012 feb.). A 10920 és 17433-as számú izolátumok korábbi munkánkban, RPMI-1640-ben paradox növekedést mutattak 16 és 32 mg/l koncentrációkon (Varga és mtsai. 2008). A 10920-as számú izolátum ellen az egyszeri 6 mg/kg-os caspofungin dózis hatékony volt 10 órával az intravénás fertőzés alkalmazása után, neutropéniás egérmodellben (Bayegan és mtsai. 2011). A két *C. parapsilosis sensu stricto*, a CP25-ös *C. orthopsilosis* és a CP92-es *C. metapsilosis* izolátumok ellen a caspofungin ≤ 16 mg/l koncentrációkon fungisztatikus volt. A CP85 és CP125 *C. orthopsilosis* izolátum ellen a caspofungin ≥ 2 és 16 mg/l koncentrációkon fungicid hatású volt. Hasonlóan, a CP5 és CP86 *C. metapsilosis* izolátumok ellen a caspofungin ≥ 1 és ≥ 8 mg/l koncentrációkon szintén fungicid hatású volt (Varga és mtsai. 2008). A caspofungin rezisztenciával rendelkező DPL20 (F645P) *C. albicans* izolátum, a University of Medicine and Dentistry of New Jersey-ről, David Scott Perlin Professzor Úr laboratóriumából származik. A *Candida orthopsilosis* és *Candida metapsilosis* törzseket Olaszországból Arianna Tavanti (Università di Pisa, Pisa, Olaszország) biztosította. A különböző klinikai izolátumok azonosítása már korábban megtörtént molekuláris biológiai és hagyományos módszerek segítségével (Varga és mtsai. 2008, Tavanti és mtsai. 2005, Szilágyi és mtsai. 2012 május).

A klinikai izolátumok azonosítói	A beteganyag típusa	Az izolált gombafaj beszerzési helye
<i>Candida albicans</i>		
17433	Vér	Magyarország
10920	Vér	Magyarország
DPL20	Vér	USA
<i>Candida parapsilosis</i>		
896/1	Vér	Magyarország
9150	Vér	Magyarország
<i>Candida orthopsilosis</i>		
CP25	Köröm	Olaszország
CP85	Katéter	Olaszország
CP125	Köröm	Olaszország
<i>Candida metapsilosis</i>		
CP5	Köpet	Olaszország
CP86	Hüvely	Olaszország
CP92	Széklet	Olaszország

2. Táblázat: Az izolátumok eredete

***In vitro* érzékenységi vizsgálatok**

A caspofungin MIC értékeinek meghatározása a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) M27-A3 dokumentum előírása alapján történt, RPMI- 1640 és RPMI- 1640 +50% humán szérum (férfi, AB típusú, Sigma, Budapest) tápközegekben. Minden izolátum esetén legalább háromszor elvégeztük a MIC értékek meghatározását.

A caspofungint steril desztillált vízben oldottuk fel. A MIC értékek meghatározását RPMI-1640 esetén 0,015-8 mg/l, illetve RPMI-1640+50% humán szérumban 0,06-32 mg/l koncentráció határok között vizsgáltuk.

Sabouraud-agaron, 24 órán át tenyésztett gombákból fiziológias sóoldatban denzitométerrel 0,5 McFarland sűrűségűre állítottuk be a csíraszámot. Ezután RPMI-1640 és RPMI- 1640 +50% humán szérum (férfi, AB típusú, Sigma, Budapest) folyékony táptalajt alkalmaztunk a 10^3 CFU/ml kezdő csíraszám beállításhoz. A MIC meghatározáshoz használt 96 üregű Elisa-lemezekon gombakontroll (antifungális szert nem tartalmazó) és táptalajkontroll (sarjadzó gombát nem tartalmazó) üregeket is beállítottunk. A 24 órán át, 35 °C-on végzett inkubálás után az üregek tartalmát pipettával összeszuszpendáltuk, majd az eredményeket szemmel leolvastuk. A MIC a caspofungin azon legkisebb koncentrációja volt, melynél az üregek zavarossága jelentős - legalább 50%-os - csökkenést mutatott a gombakontrollhoz képest (CLSI, 2008).

Az idő-ölés görbék felvétele RPMI-1640+50% humán szérumban

Kísérleteinket 1998-ban Klepser és munkatársai (1998) által leírt standardizált módszer segítségével végeztük el.

A gomba izolátumokból denzitométert használva 10^5 CFU/ml kiindulási csíraszámú gomba szuszpenziót készítettünk RPMI-1640 +50% humán szérum tápközegekben. Az osztófogat 10 ml volt. A hozzáadott gyógyszer koncentráció 0,5-16x MIC értékek voltak. Figyelembe véve, hogy a napi 100, 150 és 200 mg-os dózisok embernél 21,5-40,6 mg/l csúcskoncentrációt

eredményeznek (Kiegészítő táblázatok 1/B), ezért a legnagyobb vizsgált koncentráció 32 mg/l volt (Flattery és mtsai. 2011, Migoya és mtsai. 2011, Stone és mtsai. 2002).

A megfelelő gyógyszer koncentrációkat tartalmazó csöveket 35°C-os termosztátba helyeztük és folyamatos rázatás közben 48 órán keresztül inkubáltuk. A csövekből 100-100 µl folyadékot távolítottunk el 0, 4, 8, 12, 24 és 48 óra után, és fiziológiás sóoldatban 1:10-es léptékben hígítottuk, majd Sabouraud agar felszínére 4x30 µl mintát pipettáztunk. Ezután hagytuk a táptalajokat megszáradni (kb. 15-20 perc), majd 35°C-os termosztátba raktuk 48 órára. A 48 óra leteltével a kinőtt telepeket megszámláltuk. Az élő gombasejtek (CFU) számát meghatároztuk a hígítási adatok segítségével. Végző lépésként a kapott csíraszámokat az idő függvényében grafikusán ábrázoltuk. Minden idő-ölés kísérletet minimum kétszer végeztünk el, a kapott eredményeket átlagoltuk. Fungicidnek akkor tekinthető a szer, ha a csíraszámokban legalább 99,9%-os (3-log_{10}) csökkenés tapasztalható a kiindulási inokulumhoz képest. Ha ennél kisebb a változás, akkor fungisztatikusnak tekinthető az antifungális szer az adott izolátummal szemben (Klepser és mtsai. 1998).

In vivo vizsgálatok I.

A kísérletünket BALB/c típusú hím egerekkel végeztük, melyek súlya 23-25 gramm között volt. Az állatok tartása a „Laboratóriumi Állatok Alkalmazása és Gondozása” című Irányelv szerint történt. Az egereket csoportokra osztottuk, a különböző csoportokban az egerek létszáma 7-9 darabszám között változott. Kísérleti engedély szám: 10/2008 DE MÁB.

A neutropéniás állapot kialakítását és fenntartását a ciklofoszfamiddal való kezelés tette lehetővé. A gombával való fertőzés előtt négy nappal az egerek 150 mg/kg ciklofoszfamidot kaptak intraperitoneálisan, majd a fertőzés előtti napon 100 mg/kg-ot, a fertőzés utáni második és ötödik napon szintén 100 mg/kg ciklofoszfamidot kaptak, hogy fenntartsuk az immunszupresszált állapotot (Andes és mtsai. 2010, Barchiesi és mtsai. 2006).

Oltóanyag készítés

A fertőzéshez szükséges gombafaj izolátumait (*C. albicans* 17433, 10920, DPL20; *Candida parapsilosis sensu stricto* 896/1, 9150; *Candida orthopsilosis* CP85, CP125; *Candida metapsilosis* CP86, CP5) (2. táblázat) Sabouraud táptalajra oltottuk ki két egymás utáni napon. A felfrissített izolátumokat 3-4 Sabouraud agarra szélesztettük ki. Steril vattatampon segítségével a kinőtt izolátumokat a táptalajokról eltávolítottuk, steril fiziológiás sóoldatba szuszpendáltuk, ezt követően a szuszpenziókat 10 percen keresztül 3000g fordulatszámon centrifugáltuk. A centrifugálást követően a leülepedett gombasejtekről eltávolítottuk a felülúszót, ezután újabb, steril 20-25 ml fiziológiás sóoldatot adtunk hozzájuk. A munkafolyamatot még háromszor megismételve, a negyedik centrifugálás után a felülúszót szintén eltávolítottuk, ezután 4 ml fiziológiás sóoldatot adtunk a sejtekhez. Két lépésben 1:10 arányú hígítást készítettünk a szuszpenzióból. Bürker- kamra segítségével beállítottuk a fertőzéshez megfelelő sejtszámot. A pontosság érdekében ezt kvantitatív kioltással is ellenőriztük (Szilágyi és mtsai. 2012 máj.).

Fertőzés

Az egereket a farkuk oldalsó vénáján keresztül fertőztük meg az immunszuppresszálsukat követő negyedik napon, (0,2 ml/egér). *C. albicans* izolátumoknál az oltóanyag csíraszama 8×10^4 CFU/egér, míg a „psilosis” csoport esetén 6×10^6 CFU/egér volt.

Antifungális kezelés

Az egereket napi 1, 2 és 5 mg/kg dózisú caspofunginnal (Cancidas[®]) kezeltük. A kezelés az oltás utáni második napon kezdődött, az egerek a szükséges dózisokat 0,5 ml térfogatban a hasüregbe kapták. A kontroll csoportok fiziológiás sóoldatot kaptak.

Kvantitatív csíraszám meghatározás

A hetedik napon, az egereket cervikális diszlokációval leöltük, és mindkét vesét eltávolítottuk. Steril körülmények között a veséket dörzsmozsárban elhomogenizáltuk, majd egy ml steril fiziológiás sóoldattal szuszpenziót készítettünk. Tovafutó 1:10-es léptékű hígítási sort készítettünk a homogenizátumból. A megfelelő hígításokból 100 µl mennyiséget mértünk ki Sabouraud agarra. A táptalajokat 35°C-os sötét termosztátban, 48 órán keresztül inkubáltuk. A kinőtt telepeket megszámoltuk. A vesékből kitenyésztett csíraszám logaritmusát a dózisok függvényében ábrázoltuk. (Bayegan és mtsai. 2011, Szilágyi és mtsai. 2012 máj.)

Statisztikai adatelemzés

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

In vivo vizsgálatok II.

A kísérleti elrendezés hasonló volt az előző fejezethez, ezért ebben a fejezetben csak a különbségeket fogom kiemelni.

A kísérletünket BALB/c típusú nőstény egerekkel végeztük, melyek súlya 19-21 gramm között volt. Az egereket csoportokra osztottuk, a különböző kezelt csoportokban az egerek létszáma 7-8 darabszám között változott. Négy egeret minden izolátum esetén a kezelés előtt felboncoltunk, és a veséikből meghatároztuk az élő gombasejtek számát, hogy a kezelések hatékonyságáról még több információt gyűjthessünk. A kísérletben használt izolátumok az 3. táblázatban megvastagítva láthatók.

Mivel ebben a kísérletben, az egyszeri, nagydózisú caspofungin *in vivo* hatékonyságát vizsgáltuk, ezért ugyanolyan összdózisban a napi, alacsonyabb dózis hatékonyságát is vizsgáltuk. Az egereket öt napig kezeltük intraperitoneálisan *C. albicans* (17433, 10920), *C. orthopsilosis* (CP85, CP125) és *C. metapsilosis* (CP5, CP86) izolátumok esetén 1, 2 és 3

mg/kg napi, valamint 5, 10 és 15 mg/kg egyszeri dózissal. A *C. parapsilosis sensu stricto* (896/1, 9150) izolátumoknál 3 és 4 mg/kg napi illetve 15 és 20 mg/kg egyszeri dózisokat használtunk. A rezisztens *C. albicans* (DPL20) izolátumnál 4 és 16 mg/kg napi illetve 20 és 80 mg/kg egyszeri adagolást alkalmaztunk. Ezeknek a dózisoknak a tervezésénél figyelembe vettük, azokat a nemzetközi irodalomban szereplő adatokat, amelyek az egyszer adagolt caspofunginra vonatkoznak egérben és emberben, a görbe alatti területre és a maximális szérumkoncentrációra vonatkozólag (Stone és mtsai. 2002, Migoya és mtsai. 2011, Betts és mtsai. 2009, Andes és mtsai. 2010, Louie és mtsai. 2005, Flattery és mtsai. 2011) (Kiegészítő táblázatok 1/B).

A vesékből (grammra vonatkoztatva) kitenyésztett csíraszám logaritmusát a dózisok függvényében ábrázoltuk. A statisztikai elemzés megegyezik az előző *in vivo* kísérletnél leírtaknál.

Eredmények

Az *in vitro* érzékenységi vizsgálatok eredményei

Minimális gátló koncentráció eredményei RPMI-1640 közegben

Az általunk vizsgált fajok ellen kapott MIC értékek a 3. táblázatban láthatók. A fajspecifikus határértékek alapján a *C. albicans* és a *C. parapsilosis sensu stricto* klinikai izolátumok RPMI-1640 tápközegben érzékenyek voltak a caspofungin iránt, míg a DPL20-as izolátum, ahogy várható volt rezisztens volt (1. Táblázat) (Pfaller és mtsai. 2011). A *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* izolátumok esetén fajspecifikus határérték jelenleg nincs megállapítva, de a CP92-es izolátum kivételével a *C. albicans* esetén megállapított 0,25 mg/l értéket nem haladta meg (Pfaller és mtsai. 2011).

Minimális gátló koncentráció eredményei RPMI-1640+50% szérumban

Ötven százalék humán szérumban tartalmazó tápközegben, mind a négy vizsgált faj esetén a MIC értékek emelkedtek (3. Táblázat), az emelkedés mértéke 2-32-szeres volt az RPMI-1640-es tápközegben mérthez képest. *C. albicans* esetén a 16-szoros MIC érték emelkedés ellenére a klinikai izolátumok 0,25 mg/l-es MIC értékei nem haladták meg a *C. albicans* esetén használt, RPMI-1640 jelenlétében alkalmazott fajspecifikus határértéket (1. és 3. táblázat).

Klinikai izolátumok	MIC (mg/l)		MIC értékek aránya ¹	Idő-ölés görbék eredményei 50% szérumban (mg/l)
	RPMI-1640	RPMI-50 % szérum		
Candida albicans				
17433	0.015	0.25	16x	≥0.25 fungisztatikus ²
10920	0.015	0.25	16x	≥0.25 fungisztatikus
DPL20	4	>32	8x	Nem végeztük el
Candida parapsilosis				
896/1	1	8	8x	≥8 fungisztatikus
9150	1	8	8x	≥16 fungisztatikus
C. orthopsilosis				
CP25	0.12	2	16x	≥2 fungisztatikus ³
CP85	0.12	2	16x	≥2 fungisztatikus
CP125	0.12	4	32x	≥8 fungisztatikus
C. metapsilosis				
CP5	0.25	1	4x	≥2 fungisztatikus
CP86	0.25	4	16x	≥8 fungisztatikus
CP92	0.5	1	2x	≥2 fungisztatikus ⁴

¹ Az 50%-os szérumban és RPMI-1640-ben mért MIC értékek hányadosa

² ≥1 mg/l-en a caspofungin fungicid hatású volt

³ ≥4 mg/l-en a caspofungin fungicid hatású volt

⁴ ≥8 mg/l-en a caspofungin fungicid hatású volt

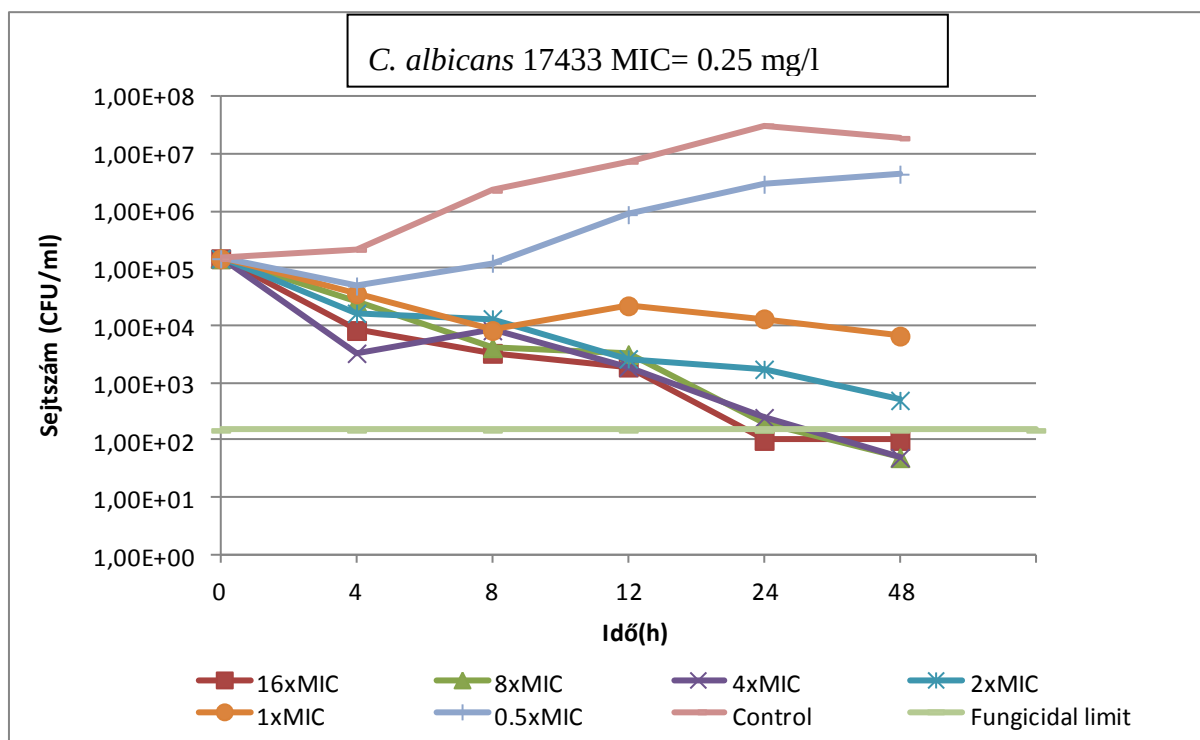
3. Táblázat: MIC értékek és idő-ölés görbék eredményi 50% szérumban

Az idő-ölés kísérletek eredményei RPMI-1640+50% szérumban

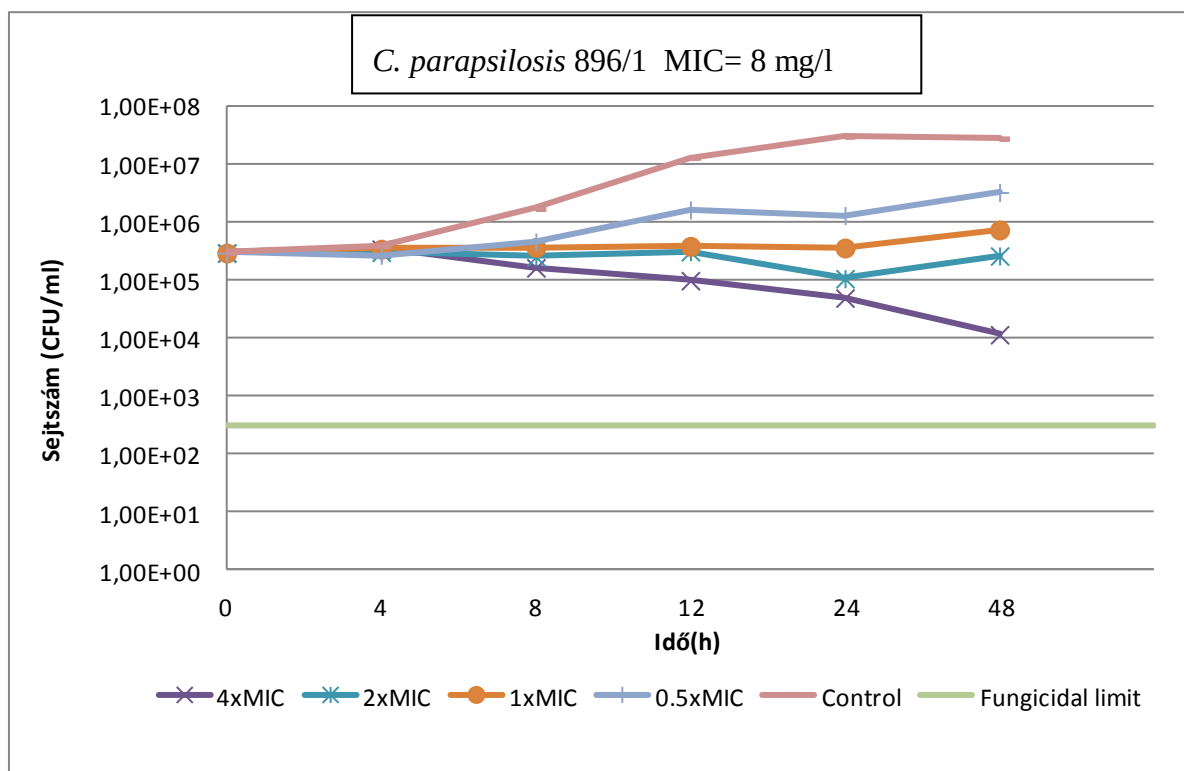
Minden izolátum jól növekedett RPMI-1640+50% szérumban. Az idő-ölés kísérletek eredményei a 3. táblázatban láthatók. A négy faj, minden izolátuma esetén 0,5 x MIC értéken az idő-ölés görbék a kontroll görbéhez hasonló lefutást mutattak, azaz gátló hatást nem tapasztaltunk.

A négy faj egy-egy reprezentatív ölési görbéje a 2-5. ábrákon láthatók.

A *C. albicans* 17433 izolátum caspofunginnal szemben a legmagasabb koncentráción (16x MIC=4 mg/l) 24 óra elteltével, míg a 4-8x MIC értékeken (1-2 mg/l) csak később 48 után volt tapasztalható a fungicid hatás. Alacsonyabb (0,25-0,5 mg/l=1-2xMIC) koncentrációk 1,35-2,30 log CFU/ml mértékben csökkentették a sejtszámot (fungisztatikus hatás) (2. ábra). A 10920-as számú izolátum esetén, 1-16xMIC értékeken 1,35-2,67 log CFU/ml csíraszám csökkenést tapasztaltunk.

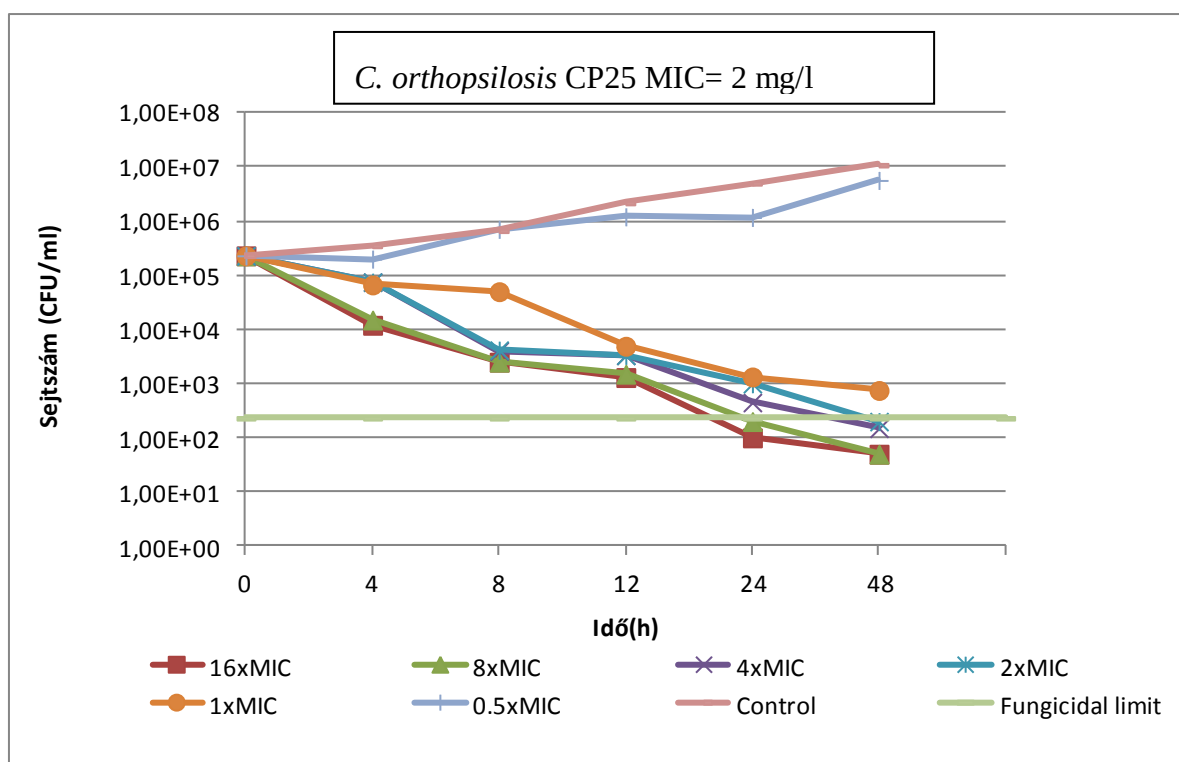


2. ábra: A *C. albicans* 17433 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje
RPMI + 50% humán szérum jelenlétében

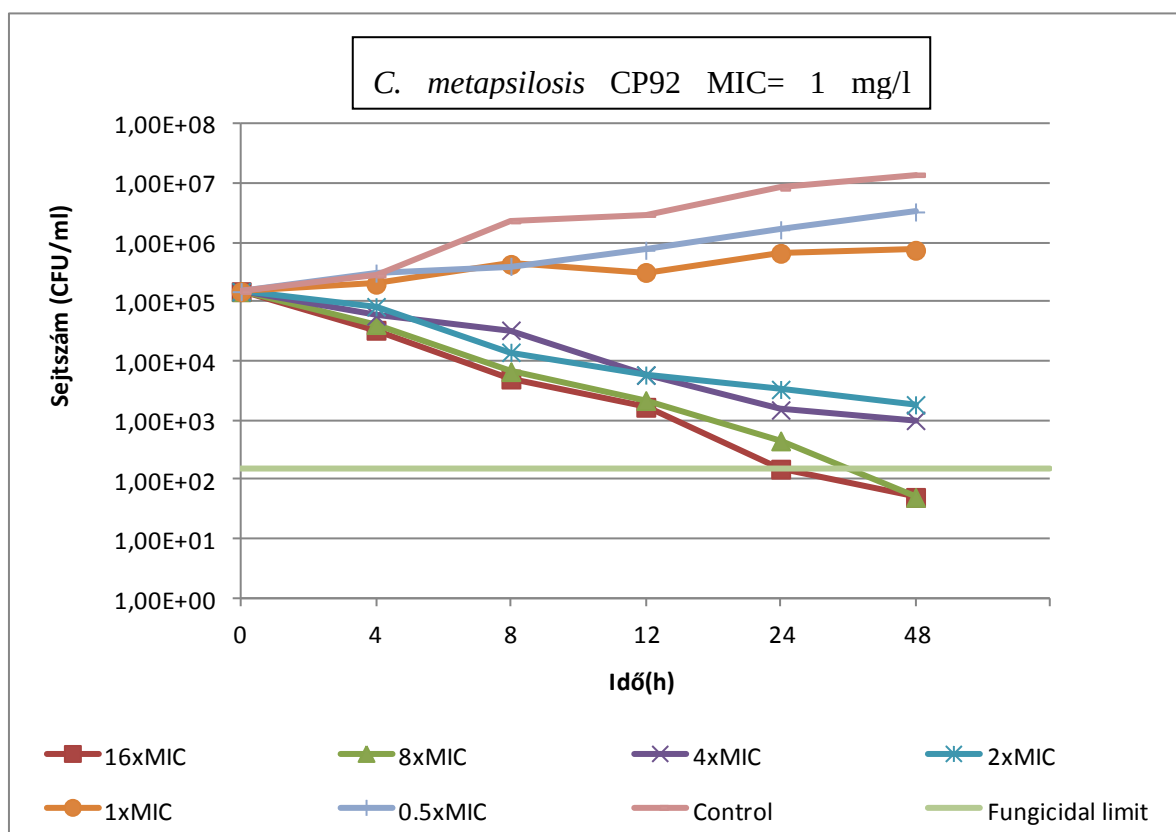


3. ábra: A *C. parapsilosis* 896/1 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje

RPMI + 50% humán szérum jelenlétében



4. ábra: A *C. orthopsilosis* CP25 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje
RPMI 1640+50% humán szérum jelenlétében



5. ábra: A *C. metapsilosis* CP92 izolátum reprezentatív idő-ölés görbéje RPMI-1640+ 50%
humán szérum jelenlétében

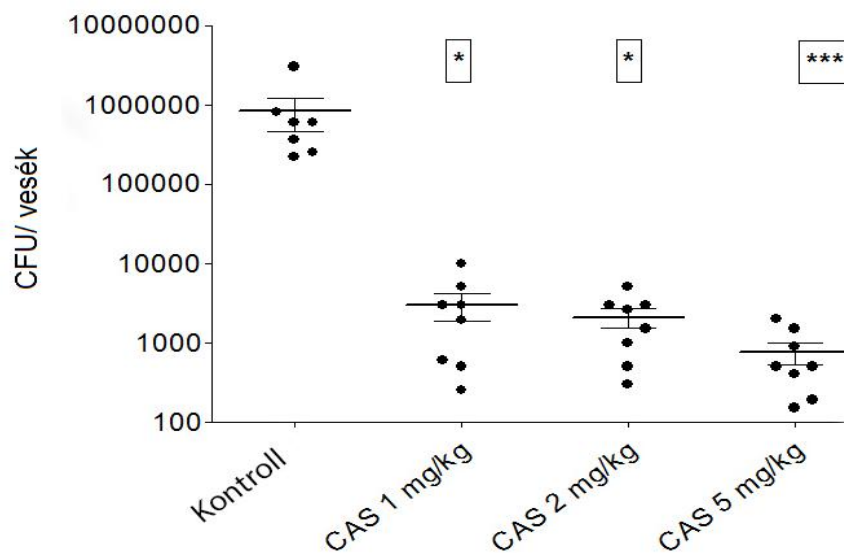
A *C. parapsilosis* izolátumoknál gyenge fungisztikus hatás tapasztaltunk 16 (0,05 log CFU/ml) illetve 32 mg/l (1,41 log CFU/ml) koncentráción (3. ábra).

C. orthopsilosis izolátumok esetében 1-2x MIC értékeken fungisztikus hatást figyeltünk meg. A reprezentatív izolátum esetén (4. ábra) 24 óra múlva 8-16x MIC (16-32 mg/l) értékeken már 24 óra elteltével fungicid hatást tapasztaltunk, de 2-4x MIC (4-8 mg/l) értékeken a hatás fungicid volt, 48 óra múlva. Hasonló ölési görbéket tapasztaltunk a *C. metapsilosis* izolátumok esetén is (3. táblázat, és 5. ábra).

Az *in vivo* érzékenységi vizsgálatok eredményei I.

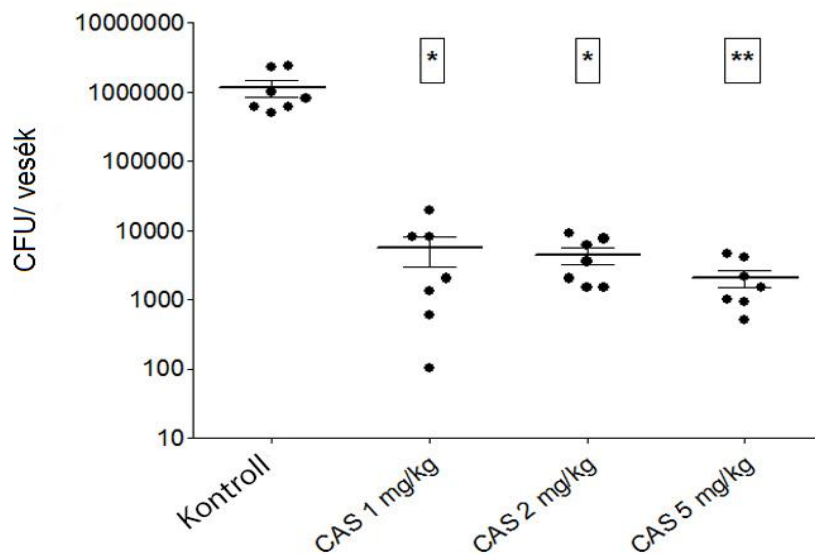
Caspofungin *in vivo* hatékonysága *C. albicans* ellen

Mindkét klinikai izolátum ellen (6. és 7. ábra) a caspofungin mindhárom dózisa legalább 2 nagyságrenddel csökkentette a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számát ($P < 0,001-0,05$). A 17433-as számú izolátum esetén 5 mg/kg dózis 3 nagyságrenddel csökkentette a vesékben a gombák számát, azaz *in vivo* is fungicid hatást tapasztaltunk. A dózisok között szignifikáns különbség nem volt ($P > 0,05$).



$P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**), $P \leq 0,001$ (***)

6. ábra: Caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. albicans* 17433 törzzsel fertőzött neutropéniás egérmodellben.

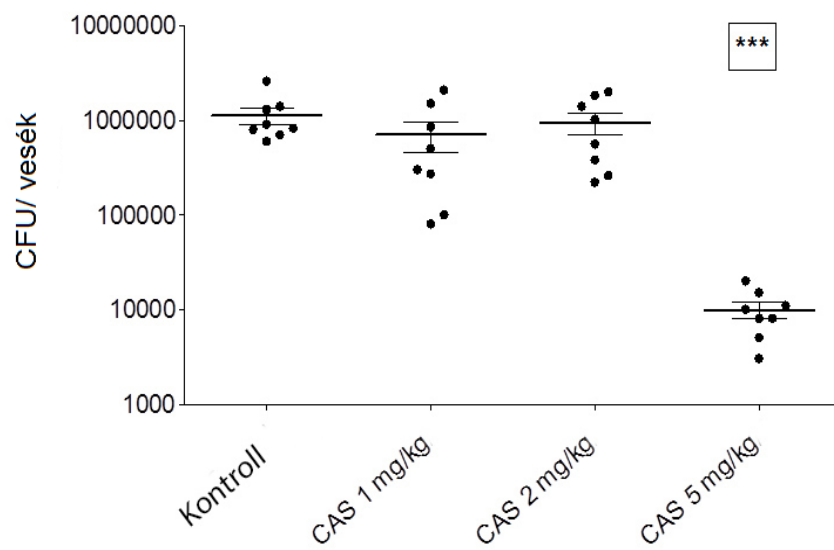


P $\square$ 0,05 (*), P $\square$ 0,01 (**), P $\square$ 0,001 (***)

7. ábra: Caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. albicans* 10920 törzzsel fertőzött neutropéniás egérmodellben.

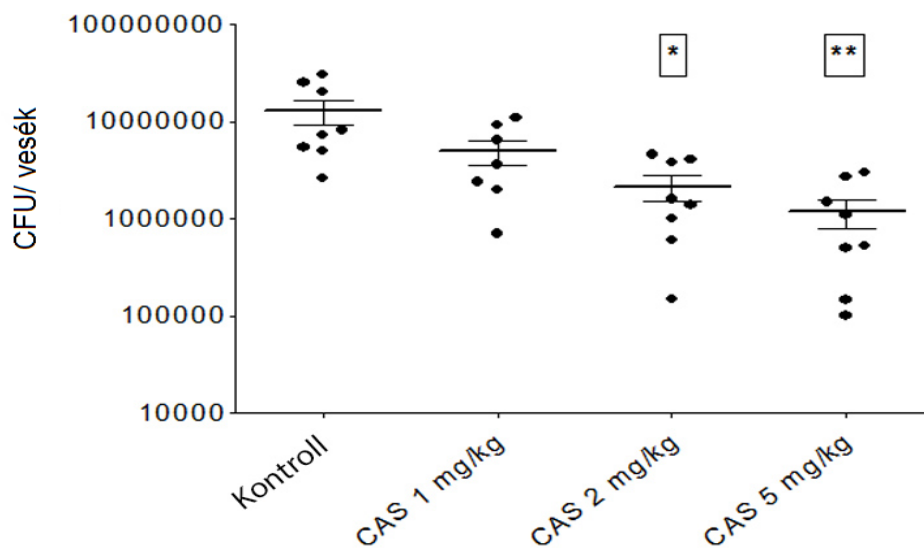
Caspofungin *in vivo* hatékonysága *C. parapsilosis sensu stricto* ellen

Mindkét klinikai izolátum ellen (8. és 9. ábra) a caspofunginnak csak a legmagasabb (5 mg/kg) dózisa volt hatásos (P <0,001-0,01), bár a 896/1-es számú izolátum ellen a napi 2 mg/kg is hatékony volt (P <0,05). A 9150-es számú izolátumnál az 1 és 2 mg/kg-os dózisok esetén a kontrollhoz hasonló mennyiségű gomba tenyésztett ki a vesékből, illetve az 5 mg/kg napi dózis hatékonyabb volt, mint a napi 1 és 2 mg/kg dózisok (P <0,05-0,01).



P $\square$ 0,05 (*), P $\square$ 0,01 (**), P $\square$ 0,001 (***)

8. ábra: Caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. parapsilosis sensu stricto* 9150 törzzsel fertőzött neutropéniás egérmodellben.

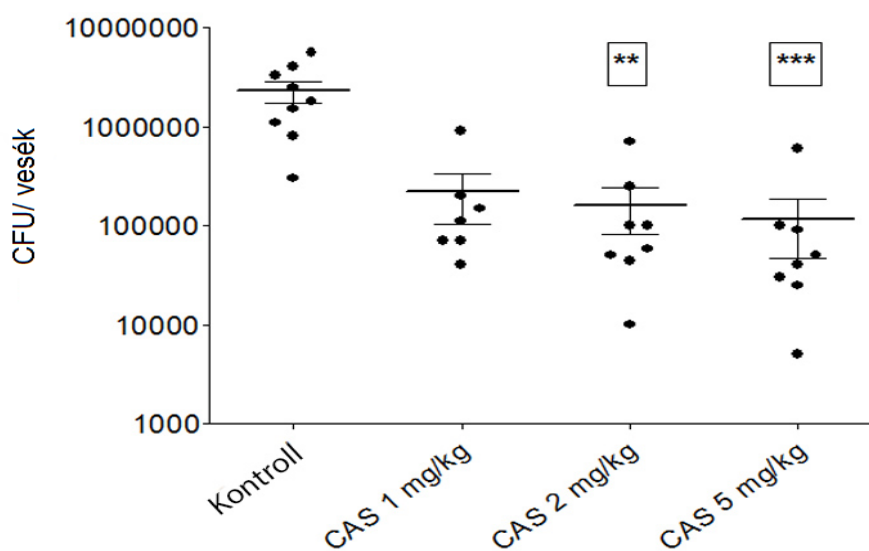


P $\square$ 0,05 (*), P $\square$ 0,01 (**), P $\square$ 0,001 (***)

9. ábra: Caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. parapsilosis sensu stricto* 896/1 törzzsel fertőzött neutropéniás egérmodellben

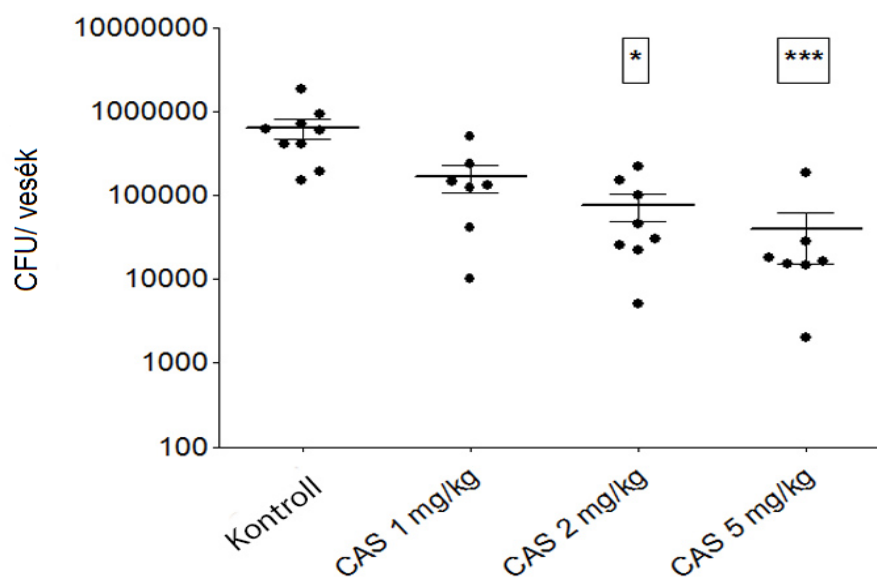
Caspofungin *in vivo* hatékonysága *C. orthopsilosis* ellen

A *C. orthopsilosis* izolátumok ellen a napi 1 mg/kg dózis egyik esetben sem csökkentette szignifikánsan a vesékből kitenyészett gombák számát, de a 2 és 5 mg/kg-os dózisok minden esetben hatékonyak voltak ($P < 0,001-0,05$) (10.-12. ábrák). A napi 5 mg/kg-os dózis leghatékonyabb a CP125-ös számú izolátum ellen volt, ahol több mint 2 nagyságrenddel csökkent a vesékből kitenyészett élő gombasejtek száma (12. ábra), illetve a napi 1 mg/kg-os dózishoz képest is hatékonyabb volt ($P < 0,05$).



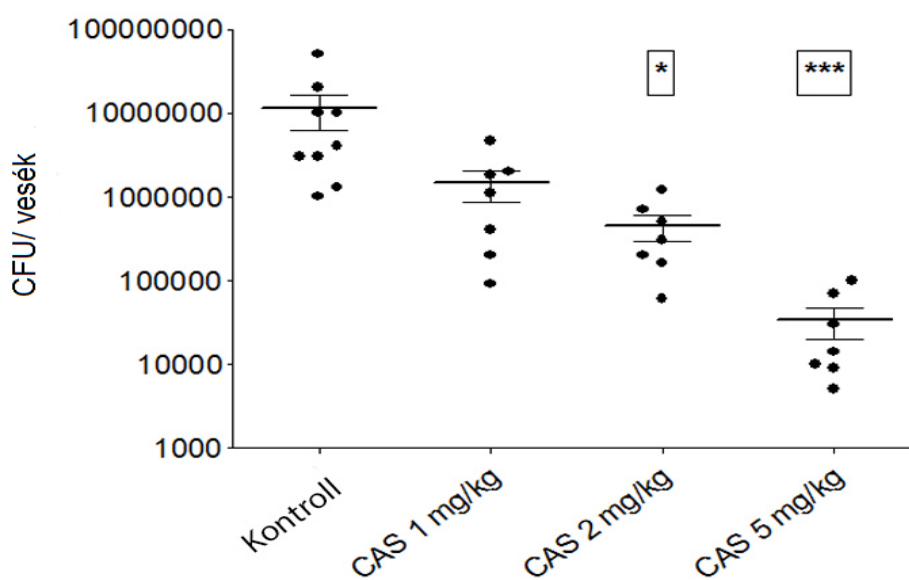
$P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**), $P \leq 0,001$ (***)

10. ábra: Caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. orthopsilosis* CP25 törzzsel fertőzött neutropéniás egérmodellben



P $\leq$ 0,05 (*), P $\leq$ 0,01 (**), P $\leq$ 0,001 (***)

11. ábra: Caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. orthopsilosis* CP85 törzsszel fertőzött neutropéniás egérmodellben

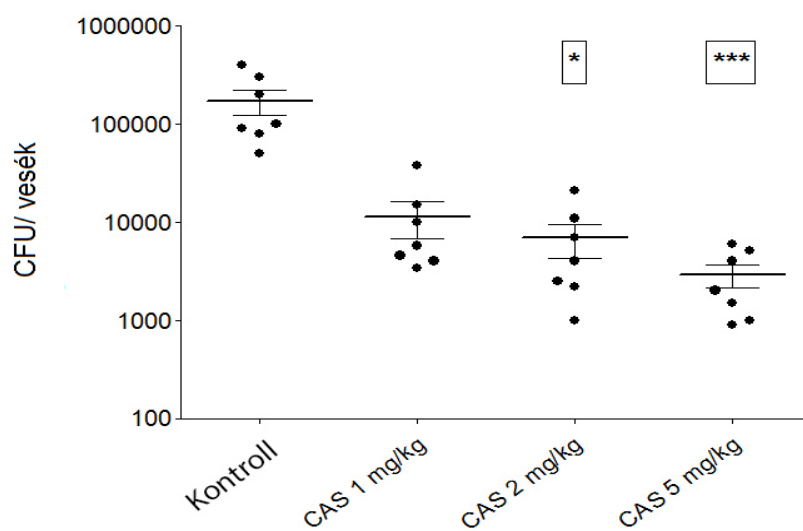


P $\leq$ 0,05 (*), P $\leq$ 0,01 (**), P $\leq$ 0,001 (***)

12. ábra: Caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. orthopsilosis* CP125 törzsszel fertőzött neutropéniás egérmodellben

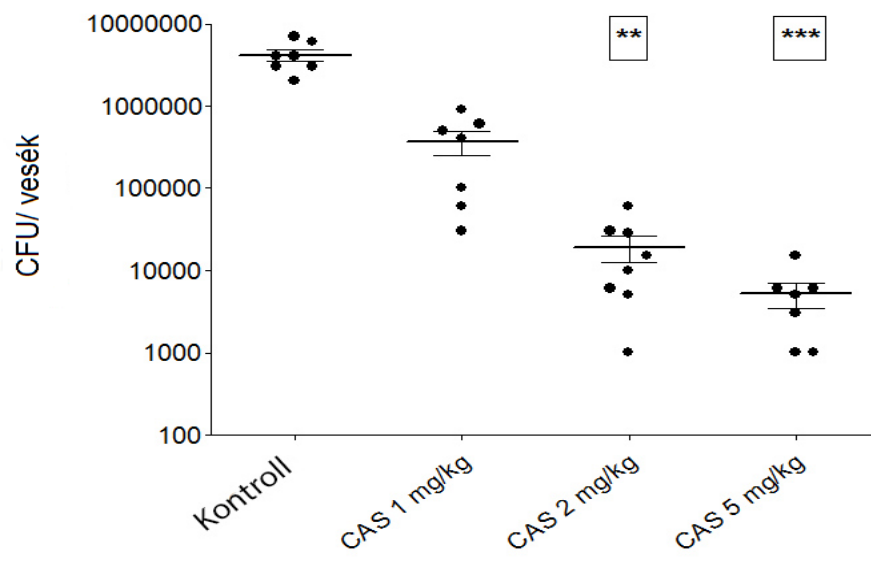
Caspofungin *in vivo* hatékonysága *C. metapsilosis* ellen

Eredményeink hasonlóak a *C. orthopsilosis* esetén kapott eredményekhez, de a napi 5 mg/kg-os dózisok legalább 2 nagyságrenddel csökkentették a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számát a kontrollokhoz képest (13.-16. ábrák). A napi 5 mg/kg a CP86 és CP92-es izolátumok esetén hatékonyabb volt, mint a napi 1 mg/kg-os dózis ($P < 0,05$).



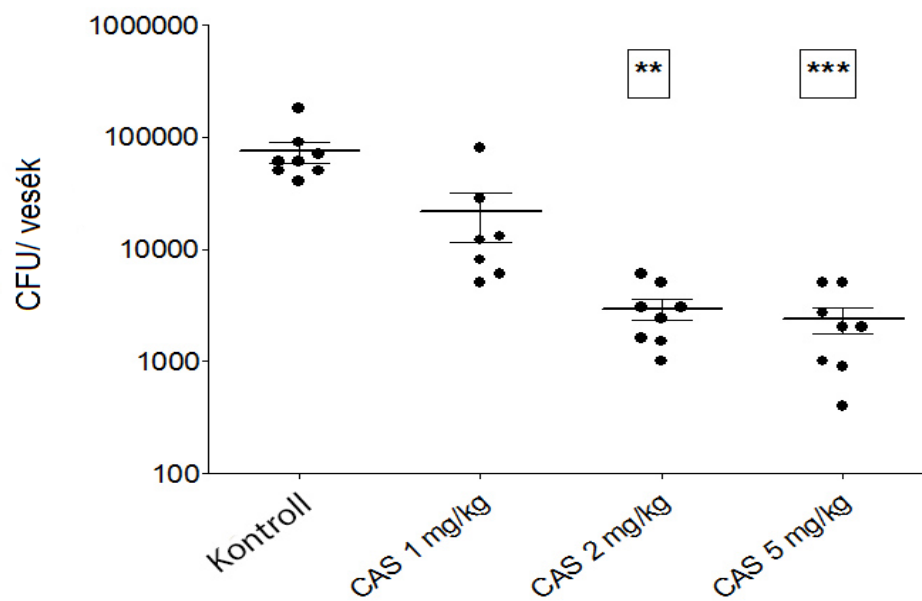
$P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**), $P \leq 0,001$ (***)

13. ábra: Caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. metapsilosis* CP5 törzzsel fertőzött neutropéniás egérmodellben



P ≤ 0,05 (*), P ≤ 0,01 (**), P ≤ 0,001 (***)

14. ábra: Caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. metapsilosis* CP86 törzzsel fertőzött neutropéniás egérmodellben



P ≤ 0,05 (*), P ≤ 0,01 (**), P ≤ 0,001 (***)

15. ábra: Caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. metapsilosis* CP92 törzzsel fertőzött neutropéniás egérmodellben

Az *in vivo* érzékenységi vizsgálatok eredményei II.

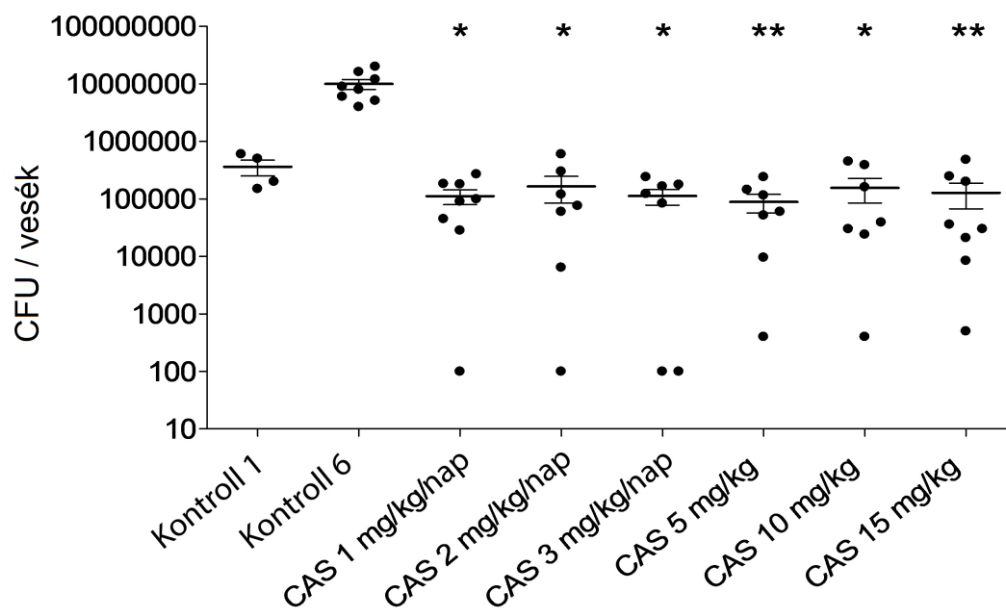
Kezdő csíraszám a kezelés megkezdésekor

A kezdő csíraszám az egyes fajok esetén hasonló volt, annak ellenére, hogy a vénás fertőzés során lényegesen kisebb dózist kaptak a *C. albicans* izolátumokkal fertőzött egerek. *C. albicans* esetén $8,1 \times 10^4$ - $7,4 \times 10^5$, *C. parapsilosis sensu stricto* esetén $8,5 \times 10^4$ - $4,7 \times 10^5$, *C. orthopsilosis* esetén $3,9 \times 10^5$ - $1,5 \times 10^6$ míg *C. metapsilosis* esetén $9,1 \times 10^4$ - $7,7 \times 10^5$ CFU/gramm volt a kontroll egerek veséiből a kezelés kezdetén kitenyészett gombák száma. A kezelési periódus végére a kontroll egerek esetén *C. albicans*, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* izolátumok esetén egy nagyságrenddel nagyobb, de 2 nagyságrenddel kevesebb volt a növekedés az egerek veséiben. A két *C. parapsilosis*

sensu stricto illetve a DPL20, echinocandin rezisztens *C. albicans* izolátumok esetén a növekedés kisebb volt egy nagyságrendnél.

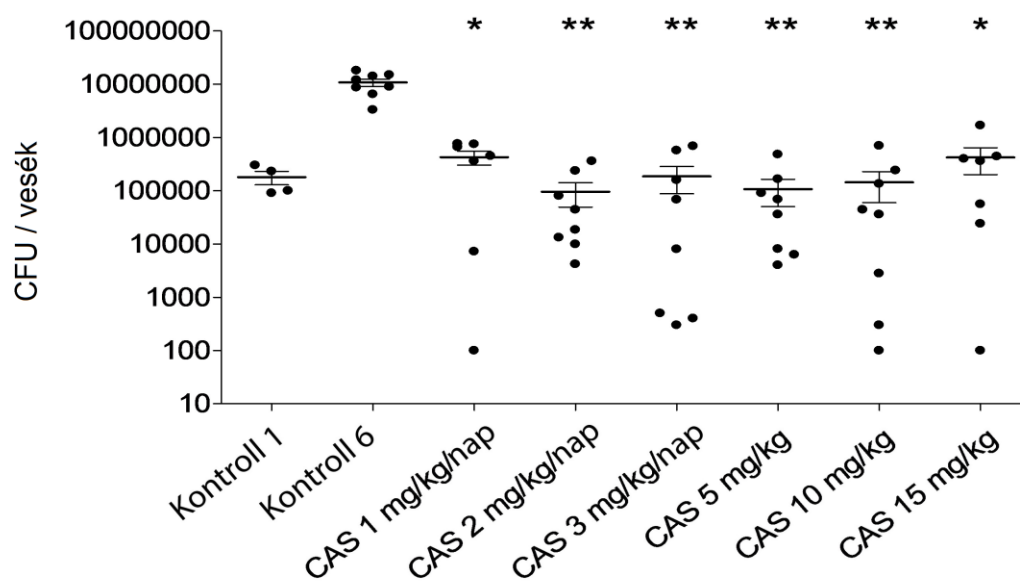
Caspofungin *in vivo* hatékonysága *C. albicans* ellen

A klinikai izolátumok ellen mind a hatféle kezelés statisztikailag is szignifikáns módon csökkentette a vesékből kitenyészett élő gombák számát, a hatodik napi kontrollhoz képest ($P < 0.05-0.01$), de az első napi kontrollhoz képest csak minimális csökkenés, jóval kisebb, mint egy nagyságrendi csökkenés fordult elő (16. és 17. ábrák). Az egyes kezelések között egyik esetben sem volt statisztikailag is szignifikáns különbség ($P > 0,05$). Érdekes, hogy a 10920-as számú izolátum esetén az első napi kontrollhoz képest, a vesékből kitenyészett gombasejtek átlagának enyhe növekedése volt megfigyelhető a napi 1 mg/kg illetve az egyszeri 15 mg/kg-os dózisok esetén (17. ábra). A DPL20-as számú izolátum esetén hatékony dózis nem volt ($P > 0,05$). Ráadásul az összes kezelési séma esetén az első napi kontrollhoz képest növekedés volt megfigyelhető, még a legnagyobb dózisok esetén is (18. ábra).



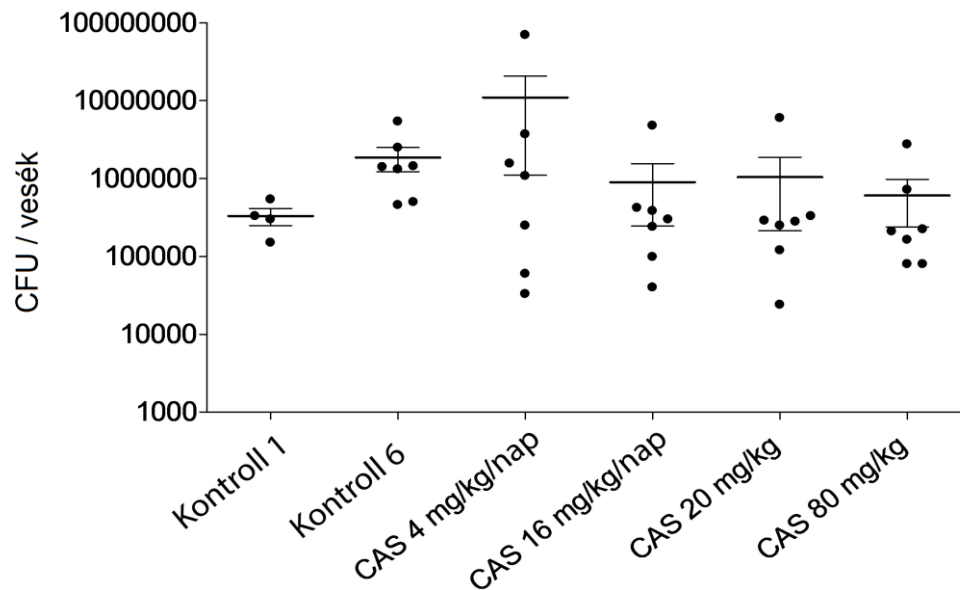
P $\leq$ 0,05 (*), P $\leq$ 0,01 (**), P $\leq$ 0,001 (***)

16. ábra: Caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. albicans* 17433 törzzsel fertőzött neutropéniás egérmodellben.



P $\leq$ 0,05 (*), P $\leq$ 0,01 (**), P $\leq$ 0,001 (***)

17. ábra: Caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. albicans* 10920 törzzsel fertőzött neutropéniás egérmodellben.



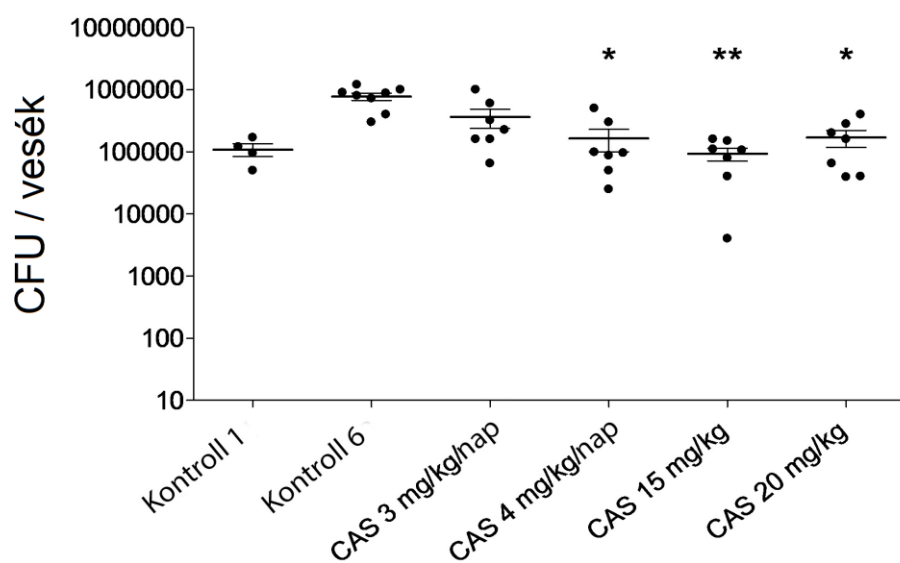
P $\square$ 0,05 (*), P $\square$ 0,01 (**), P $\square$ 0,001 (***)

18. ábra: Caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. albicans* DPL20 törzsszel fertőzött neutropéniás egérmódelben.

Caspofungin *in vivo* hatékonysága *C. parapsilosis sensu stricto* ellen

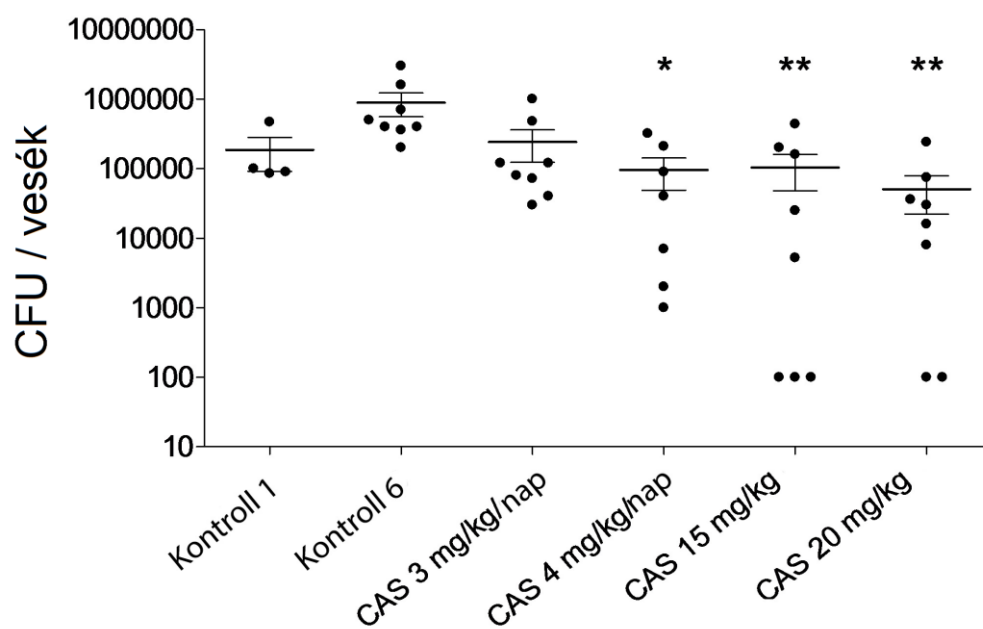
Mindkét klinikai izolátum esetén a napi 3 mg/kg dózis nem, de a napi 4 mg/kg illetve az 15 és 20 mg/kg dózisok statisztikailag is szignifikánsan csökkentették a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számát ($P < 0.05-0.01$).

Az egyes terápiás dózisok között szignifikáns különbség nem volt ($P > 0,05$).



P $\leq$ 0,05 (*), P $\leq$ 0,01 (**), P $\leq$ 0,001 (***)

19. ábra: Caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. parapsilosis sensu stricto* 896/1 törzzsel fertőzött neutropéniás egérmodellben.



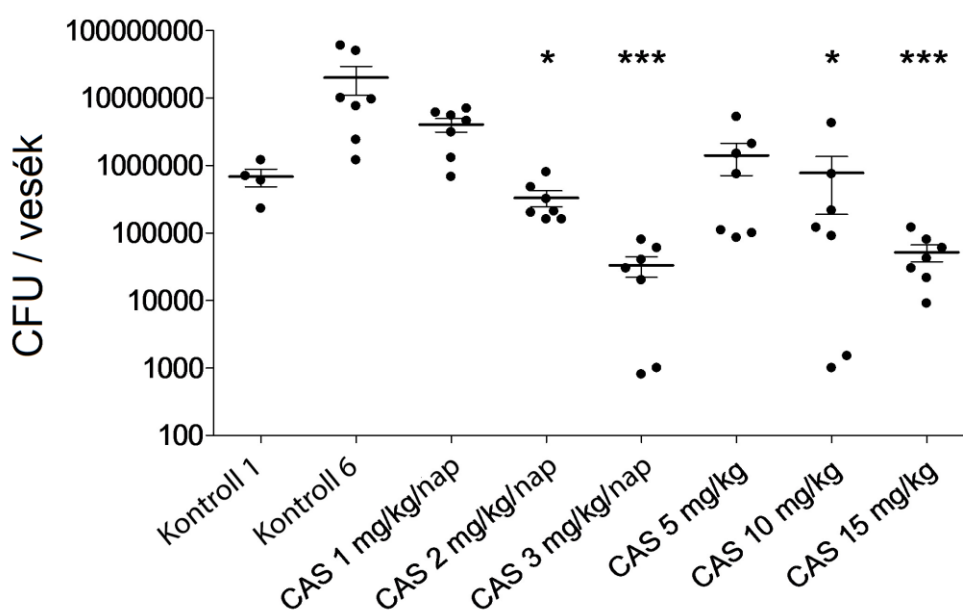
P $\leq$ 0,05 (*), P $\leq$ 0,01 (**), P $\leq$ 0,001 (***)

20. ábra: Caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. parapsilosis sensu stricto* 9150 törzzsel fertőzött neutropéniás egérmodellben.

Caspofungin *in vivo* hatékonysága *C. orthopsilosis* ellen

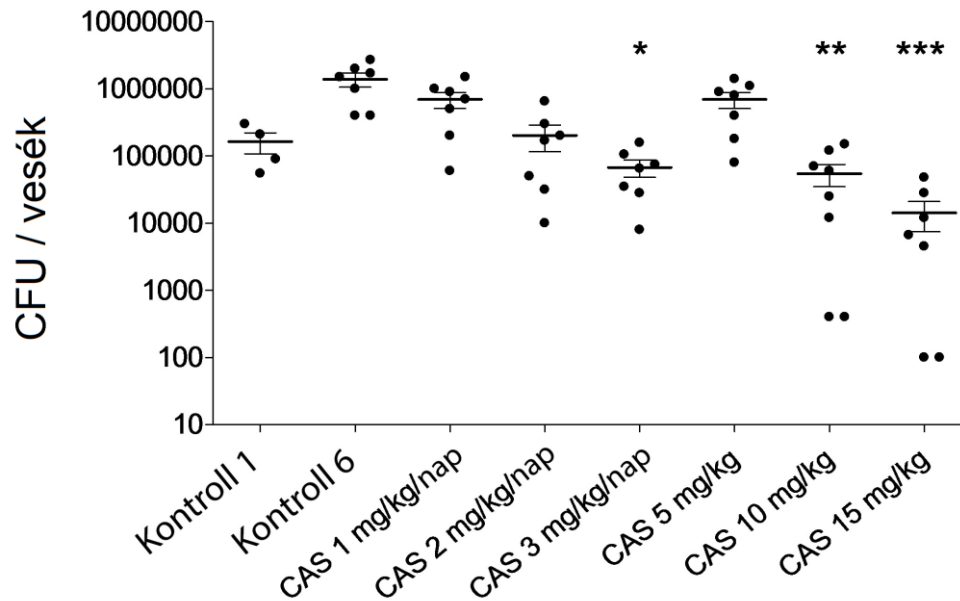
A CP85-ös számú izolátum ellen a legkisebb napi dózis (1 mg/kg) és az ezzel korrespondáló egyszeri dózis (5 mg/kg) nem voltak hatékonyak, de a többi kezelési séma szignifikánsan csökkentette a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számát ($P < 0.05-0.001$) (21. és 22. ábrák). A napi 3 mg/kg-os illetve egyszeri 15 mg/kg-os dózisok még az első napi kontrollhoz képest is legalább 1 nagyságrenddel csökkentették a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számát. A CP125-ös izolátum esetén, csak a napi 3 mg/kg illetve az egyszeri 10 és 15 mg/kg-os napi dózisok voltak statisztikailag is szignifikáns módon hatékonyak ($P < 0.05-0.001$).

A CP85-ös izolátum esetén a napi 3 mg/kg-os és az egyszeri 15 mg/kg-os dózis hatékonyabb volt, mint a napi 1 mg/kg-os dózis ($P < 0.01$ mindkét esetben), illetve a CP125-ös izolátum esetén az egyszeri 15 mg/kg-os hatékonyabb volt a napi 1 mg/kg-os és az egyszeri 5 mg/kg-os dózissal ($P < 0.01$ mindkét esetben).



P $\square$ 0,05 (*), P $\square$ 0,01 (**), P $\square$ 0,001 (***)

21. ábra: Caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. orthopsilosis* CP85 törzzsel fertőzött neutropéniás egérmodellben.

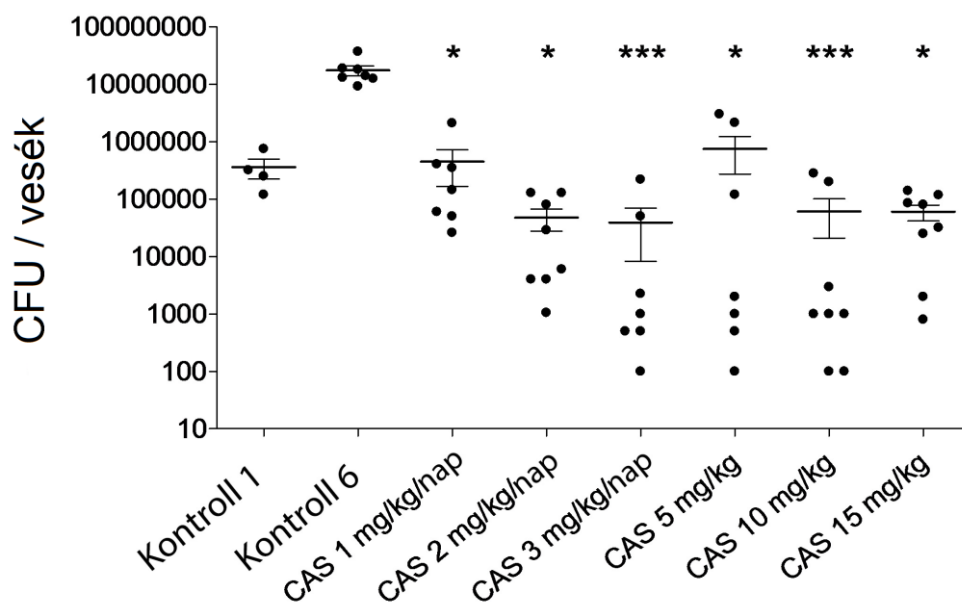


P ≤ 0,05 (*), P ≤ 0,01 (**), P ≤ 0,001 (***)

22. ábra: Caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. orthopsilosis* CP125 törzzsel fertőzött neutropéniás egérmodellben

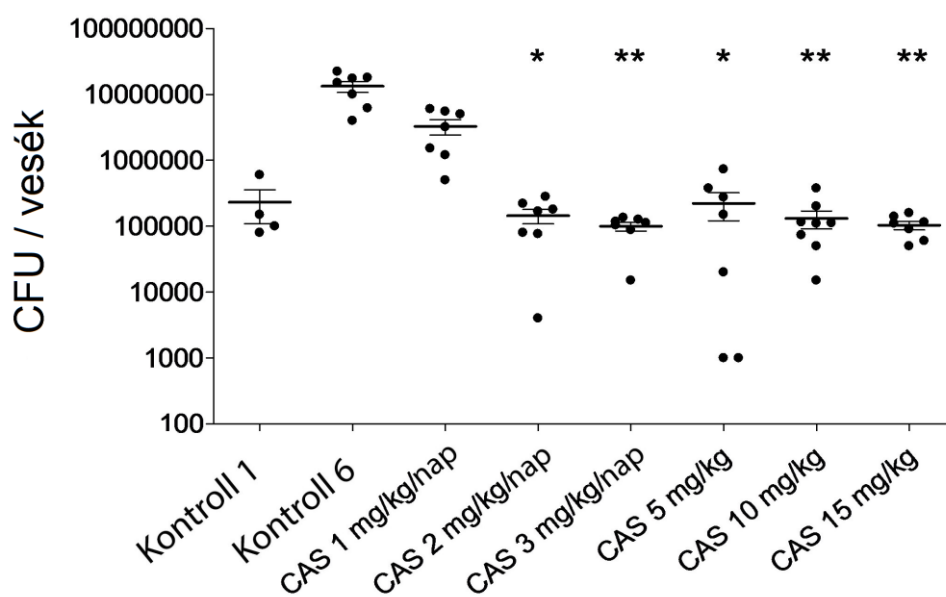
Caspofungin *in vivo* hatékonysága *C. metapsilosis* ellen

Az összes alkalmazott dózis, kivéve a napi 1 mg/kg-ot, a CP86-os számú izolátumnál, szignifikáns módon csökkentette a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számát (23. és 24. ábra). Az első napi kontrollokhoz képest, kevesebb, mint egy nagyságrendnyi csökkenést észleltünk. Az egyes terápiás dózisok között szignifikáns különbség nem volt ($P > 0,05$).



P $\leq$ 0,05 (*), P $\leq$ 0,01 (**), P $\leq$ 0,001 (***)

23. ábra: Caspofungi (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. metapsilosis* CP5 törzzsel fertőzött neutropéniás egérmodellben



P $\leq$ 0,05 (*), P $\leq$ 0,01 (**), P $\leq$ 0,001 (***)

24. ábra: Caspofungin (CAS) *in vivo* hatékonysága a *C. metapsilosis* CP86 törzzsel fertőzött neutropéniás egérmodellben

A kísérleti munkában résztvevő társszerzők munkájának ismertetése

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

Berényi R., Kovács R., Domán M., Gesztelyi R., Kardos G., Juhász B., Perlin D., Majoros L. 2014. Efficacy of single large doses of caspofungin in a neutropenic murine model against the “psilosis” group. *New Microbiologica*, 37, 333-340.

A klinikai minták beszerzése és azonosítása: Ariana Tavanti, David Perlin, Berényi Réka, Kovács Renátó, Domán Mariann.

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

In vivo kísérletek elvégzése: Berényi Réka, Domán Mariann, Kovács Renátó.

A kísérletes munka tervezése, eredmények kiértékelése: Berényi Réka, dr. Kardos Gábor, dr. Majoros László.

Kézirat revízió: dr. Majoros László

Földi R., Kovács R., Gesztelyi R., Kardos G., Berényi R., Juhász B., Szilágyi J., Mózes J., Majoros L. 2012. Comparison of In Vitro and Vivo Efficacy of Caspofungin Against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*. *Mycopathologia*. 2012 Oct;174(4):311-8.

A klinikai minták beszerzése és azonosítása: Ariana Tavanti, Berényi Réka, Földi Richárd, Kovács Renátó, Domán Mariann.

Az izolátumok CAS iránti MIC értékének meghatározása: Földi Richárd, Berényi Réka, Kovács Renátó

Idő-ölés kísérletek elvégzése CAS esetén: Földi Richárd, Berényi Réka, Kovács Renátó

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

Kézirat revízió: dr. Majoros László

Megbeszélés

Az invazív bakteriális és gombafertőzések gyakorisága az 1970-es évektől kezdve jelentős növekedést mutatott. Kezdetben inkább a Gram-negatív kórokozók (*Escherichia coli*, különböző *Klebsiella* fajok, a *Pseudomonas aeruginosa* és az *Acinetobacter baumannii*) számítottak a legfontosabb és nehezen kezelhető kórokozók közé, de nem sokkal később a Gram-pozitív kórokozók (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* fajok) gyakoribbá váltak a nozokomiális véráramfertőzések esetén. Az epidemiológiai változásban a korszerűbb antibiotikumok megjelenése (harmadik, majd a negyedik generációs cephalosporinok, a fluorokinolonok), a betegek jobb túlélése az intenzív terápiás ellátás javulása miatt egyaránt szerepet játszottak. (Diekema és mtsai. 2012, Kang és mtsai. 2014, Lockhart és mtsai. 2007, Wisplinghoff és mtsai. 2004, Diekema és mtsai. 1999).

Wisplinghoff és munkatársai (2004), mostanra csaknem klasszikussá váló közleménye, amely 24179 véráramfertőzést vizsgált az Egyesült Államok kórházaiban 1995-2002 között, további ismeretekkel gyarapította a tudásunkat a nozokomiális fertőzésekkel kapcsolatban. Eredményeik szerint, bár a leggyakoribb véráram fertőző kórokozók továbbra is a Gram-pozitív baktériumok (koaguláz-negatív *Staphylococcusok*: 31,3%, *S. aureus*: 20,2%, *Enterococcus* fajok: 9,4%), a negyedik leggyakoribb kórokozókká a különböző *Candida* fajok léptek elő (9%). A vizsgálatból kiderült, hogy a kórházba kerülés után kb. 20 nappal kezdődött a *Candida* fajok betörése a véráramba. Gyermekgyógyászati és urológiai osztályokon a második, míg az általános sebészeti osztályokon a harmadik leggyakoribb patogén voltak a *Candida* fajok. A mortalitás az összes kórokozót figyelembe véve a *Candida* fajok esetén volt a legmagasabb (39,2%), megelőzve a *S. aureus* (25,4%), a *P. aeruginosa* (38,7%) és az *Acinetobacter* (34%) fajokat is. A vizsgálatból az is kiderült, hogy az 1890 izolátum közül a *C. albicans* a leggyakoribb (54%), amelyet a *C. glabrata* (19%), a *C. parapsilosis* (11%), a *C. tropicalis* (szintén 11%) és a *C. krusei* (2,4%) követnek. A vizsgált időszakban másfélszeres növekedést észleltek a véráram *Candida* fertőzéseit tekintve (1995-ben a véráram fertőzéseinek 4%-a, míg 2002-ban 8%-a volt valamilyen *Candida* faj) és szintén növekedett a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* által okozott fertőzések száma. Ezeket a vizsgálati eredményeket, azóta számos tanulmány megerősítette (Naglik és mtsai. 2003, Horn és mtsai. 2009, Lockhart és mtsai. 2007, Pittet és mtsai. 1997). Mindazonáltal Kang és

munkatársai (2014) friss tanulmányukban kimutatták, hogy a leggyakoribb patogének által okozott fertőzések incidenciája, beleértve a *Candida* fajokat is, gyakorlatilag a felére csökkent, miközben szignifikáns mértékben emelkedett a *Clostridium difficile* okozta fertőzések száma.

Ezek az adatok jelzik, hogy az invazív *Candida* fertőzések jelentős problémát okoznak a különböző egészségügyi intézményekben, megnövelve a kórházi tartózkodást, és a jelentős költségnövekedés ellenére a mortalitás igen magas. A leggyakoribb *Candida* faj még mindig a *C. albicans*, de a nem *C. albicans* fajok okozta invazív fertőzések száma az utóbbi 3 évtizedben növekszik. Ebben részben a fluconazolnak az 1991-es bevezetése éppúgy közrejátszik, mint az első echinocandinnek, a caspofunginnak a 10 évvel későbbi bevezetése a terápiás gyakorlatba (Bennett 2006, Glöckner és mtsai. 2008, Pfaller és mtsai. 2007 dec., Szabó és mtsai. 2009, Arendrup és mtsai. 2002).

Pfaller és munkatársai 2012-es közleményükben összegezték prospektív, 3648 beteget érintő vizsgálatukat, amelyben az USA-ból 23 központ és Kanadából 2 központ vett részt. Munkájukban nemcsak a fajok megoszlása, a rizikófaktorok, a mortalitás, de a felhasznált antifungális szerek is összegezve voltak az egyes fajoknak megfelelően (Pfaller és mtsai. 2012 dec.). Vizsgálataik megerősítették a rizikófaktorokra vonatkozó korábbi adatokat. Így a *C. albicans*, mint leggyakrabban (42,1%) izolálható patogénnél a nem traszplantációs indokkal végzett sebészeti beavatkozás, a diabetes mellitus, perifériás katéter jelenléte és a szteroid terápia voltak a fő prediszponáló tényezők, de a neutropénia nem. Az 1499 betegből 1216 kapott fluconazolt és 679 valamilyen echinocandint. A második leggyakoribb fajnál (26,7%), a *C. glabrata* esetén volt a legmagasabb a betegek átlag életkora (58 év), a diabetes mellitus, perifériás katéter jelenléte, korábbi szteroid terápia, illetve korábbi antifungális kezelés szerepeltek az anamnézisben. A 903 betegből 468 kapott fluconazolt és 677 valamilyen echinocandint. A *C. parapsilosis* (nem volt további molekuláris biológiai azonosítás) 15,9%-al a harmadik leggyakoribb gomba volt, és gyermekgyógyászati osztályokon, perifériás katétert viselőknél, teljes parenterális táplálásban részesülőknél fordult elő a leggyakrabban. Az 531 beteg közül 412 kapott fluconazolt, és 272 beteg valamilyen echinocandint. Még tanulságosabb az a 113 beteg, akik *C. krusei* okozta candidemiában szenvedtek, akiknél a fő rizikófaktorok a neutropénia, a szteroid terápia és a hematológiai alapbetegségek voltak. A közismert fluconazol rezisztencia ellenére a betegek egy része nemcsak profilaktikusan, de terápiásan is fluconazolt kapott, bár a terápia döntő mértékben az echinocandinokon alapult

(104 beteg). A tanulmányban a fajspecifikus halálozás a következőképpen alakult a candidemia észlelése után 90 nappal: *C. albicans* 37,9%, *C. krusei* 46,4%, *C. glabrata* 42,4%, *C. tropicalis* 44,1% és *C. parapsilosis* 30%, jórészt egyezve korábbi tanulmányok eredményeivel (Axner-Elings és mtsai. 2011, Horn és mtsai. 2009, Pfaller és mtsai. 2012 dec., Naglik és mtsai. 2003, De Luca és mtsai. 2012). Fontos kiemelni, hogy az alkalmazott terápia döntően megfelelt a legfrissebb, nemzetközileg ajánlott terápiának (Pappas és mtsai. 2009). Ez azt jelenti, hogy hemodinamikailag stabil, nem neutropéniás betegek kezelésénél, ha a kórokozó a *C. albicans*, a *C. tropicalis*, vagy a *C. parapsilosis* akkor fluconazol az elsőként választandó szer, ha a kórokozó érzékeny fluconazol iránt. *C. krusei* vagy *C. glabrata* esetén a választás valamelyik echinocandin kell, hogy legyen. Mint kitűnik, *C. albicans* és *C. parapsilosis* esetén általában a fluconazol volt a leggyakrabban használt antifungális szer, bár igen gyakran használtak echinocandint is. A legmodernebb ajánlásokat követve is a fajspecifikus mortalitás 30-46,4% volt.

A Debreceni Egyetem, Orvosi Mikrobiológiai Intézetében a különböző klinikai egységekből az 1995-1999 évek között 4-11, míg 2000 és 2010 között 21-34 különböző betegből izoláltunk valamilyen *Candida* fajt. Bár a vizsgált kezdeti időszakban a *C. albicans* volt a domináns faj ($\geq 82\%$), az utóbbi 10 évben, a nem-*C. albicans* fajok által okozott invazív fertőzések száma 54-65% között alakult. A leggyakrabban ($> 95\%$ -ban) használt fluconazol és amphotericin B alkalmazása mellett a fajspecifikus mortalitás az 1995-2010 közötti időszakban sokkal magasabb volt a nemzetközi adatokhoz képest: *C. albicans*: 60%, *C. glabrata* 64%, *C. krusei* 57%, *C. tropicalis* és *C. parapsilosis* 50-50%. Az antifungális rezisztencia fluconazol és amphotericin B iránt *C. albicans*, *C. tropicalis* és *C. parapsilosis* esetén minimális volt ($< 2\%$), de a *C. glabrata* izolátumoknak csak 62%-a volt érzékeny fluconazol iránt az új break-pointok alapján (Pfaller és mtsai. 2013). A vizsgált időszakban minimális (kevesebb, mint 10 esetben) esetben használtak echinocandint a betegek kezelésére (nem publikált adatok). Adatainkból kitűnik, hogy a régi antifungális szerekkel történő gyógyítás messze nem eredményes a nemzetközi adatokkal összehasonlítva, különösen, ha figyelembe vesszük azt is, hogy a betegeknek csak 8%-a volt neutropéniás a candidemia időpontjában.

Vizsgálatainkban a legvirulensebb (*C. albicans*) és a legkevésbé virulens (*C. parapsilosis*) *Candida* fajok *in vitro* és *in vivo* érzékenységét vizsgáltuk a legkorábban bevezetett caspofungin iránt. Választ kerestünk arra, hogy az RPMI-1640-ben mért MIC értékek

milyen mértékben emelkednek RPMI-1640+50% szérum jelenlétében, és a két tápközegben mennyire érvényesül a caspofungin ölü hatása *C. albicans* és a „psilosis” komplex tagjai ellen. Ugyanazon vizsgált izolátumokat kétféle terápiás stratégiát alkalmazva neutropéniás egérmodellben is vizsgáltuk, és összefüggést kerestünk az *in vitro* és *in vivo* eredmények között.

C. albicans izolátumok esetén a MIC értékek RPMI-1640+50% szérum tesztközegben, bár emelkedtek, már alacsony ($\geq 0,25$ mg/l) koncentrációkon is kitűnő fungisztikus hatást figyeltünk meg az idő-ölés kísérletekben. A 0,25 mg/l-es koncentráció abból a szempontból is érdekes, hogy nem haladja meg a CLSI (2012) esetén javasolt fajspecifikus határértéket. *In vivo* eredményeink nagymértékben korrelálnak az *in vitro* eredményekkel, hiszen már a napi 1 mg/kg-os dózis is mindkét izolátum ellen, mindkét kísérletben szignifikáns mértékben csökkentette a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számát. Mivel a farmakodinámiás target (a gomba) mind a kísérleti állatban, mind pedig emberben azonos (Andes és mtsai. 2010), ezért ha a görbe alatti területek, illetve a csúcskoncentrációk megegyeznek, akkor hasonló *in vivo* hatékonyságot várhatunk állatban és emberben egyaránt. A napi 1 mg/kg-is dózis egérben 3,6-5,04 mg/l csúcskoncentráció értéket illetve 35,49-53,59 mg·h/l görbe alatti területet (AUC) eredményez. Az egérkísérletben alkalmazott napi 1 mg/kg-os dózis emberben napi 35 mg/kg-os dózissal felel meg, ami 5,97 mg/l csúcskoncentrációt és 54,9 mg·h/l görbe alatti területet (AUC) eredményez (Kiegészítő táblázatok 1/B). Hasonlóan az egérnél alkalmazott napi 2 és 5 mg/kg kezelés emberben napi 50 mg illetve 70 mg-os dózissal felel meg (Kiegészítő táblázatok 1/A) (Stone és mtsai. 2002, Migoya és mtsai. 2011, Betts és mtsai. 2009, Gumbo 2007, Andes és mtsai. 2010, Louie és mtsai. 2005, Flattery és mtsai. 2011).

Hasonlóan választottuk az egyszeri, nagydózisban alkalmazott kezeléseket is, hogy a görbe alatti területek és/vagy a C_{max} értékek hasonló értékeket vegyenek fel. Ezek alapján a 10920-as és a 17433-as *C. albicans* izolátumok ellen az egyszeri 5, 10 és 15 mg/kg-os dózisok éppúgy hatékonyak voltak, mint a napi 1, 2 és 3 mg/kg-os dózisok. Eredményeink megegyeznek az irodalomban található hasonló kísérleti modellek eredményeivel (Louie és mtsai 2005, Bayegan és mtsai. 2011, Stone és mtsai. 2002, Cornely és mtsai. 2011). Feltűnő, hogy az első napi kontrollhoz képest csak szerény mértékű csíraszám csökkenést tapasztaltunk, hasonlóan Howard és munkatársai (2011) eredményeihez *C. glabrata* esetén. Ez az eredmény felhívja a figyelmet arra, hogy neutropéniás egyének esetén az echinocandin

terápia nem biztos, hogy eliminálja a kórokozót, azaz a kezelés során is csak fungisztikus hatást érhetünk el. Így, a normál dózissal történő kezelés (Pound és mtsai. 2010, Pappas és mtsai. 2009, Pappas és mtsai. 2007) idő előtti megszakításakor a belső szervekben még sok kórokozó található, amelyek az antifungális szer hiányában gyors növekedésnek indulva a beteg halálát okozhatják.

Más volt a helyzet az echinocandin rezisztens, homozigóta mutációval rendelkező DPL20-as törzs esetén. Itt semmilyen dózis nem volt hatékony, ráadásul az első napi kontrollhoz képest bármilyen kezelési séma esetén növekedést tapasztaltunk. A két érzékeny izolátumhoz képest a hatodik napon a kontroll egerekből kitenyészett élő gombasejtek száma alacsonyabb volt, jelezve, hogy a virulenciája kisebb a másik két (vad) izolátumhoz képest. Eredményeink hasonlóak Wiederhold és munkatársai (2011) illetve Ben-Ami és munkatársai (2011) eredményeihez.

A „psilosis” komplex tagjai sokkal kevésbé virulensek, mint a *C. albicans* (Arendrup és mtsai. 2002, Andes és mtsai. 2010). *In vivo*, nem-neutropéniás egérmodellben, a *C. albicans* 10^7 CFU/egér dózisa 100 %-os pusztulást, míg a *C. parapsilosis* esetén ugyanazon dózis 100 %-os túlélését eredményezett (Arendrup és mtsai. 2002). Mivel a „psilosis” komplex tagjai főleg nem neutropéniás betegekben okoznak fertőzést, ezért megfelelő állatmodell kidolgozása fontos a különböző antifungális szerek hatékonyságának a megfelelő értékelése szempontjából. Másrésről, az antifungális szer valódi hatásának a mérésére a neutropéniás állatmodellek megfelelőbbnek tűnnek (Flattery és mtsai. 2011, Migoya és mtsai. 2011, Stone és mtsai. 2002).

Arendrup és munkatársai kéziratán kívül csak Dimopoulou és munkatársai (2014) használtak nem-neutropéniás egérmodellt, a *C. parapsilosis sensu stricto* okozta fertőzések caspofunginnal történő kezelésének a vizsgálatára. Az izolátumok között caspofungin iránt mérsékelten érzékeny illetve rezisztens izolátumok is voltak, és a szerzők reprodukálható, szubakut invazív candidiasis modellt hoztak létre intravénás fertőzés által (Dimopoulou mtsai. 2014). A caspofungin iránt rezisztens izolátumot az érzékeny izolátumhoz képest csökkent virulenciájuknak találták egérmodellükben. Napi 1 és 10 mg/kg caspofungin illetve 1 mg/kg anidulafungin hatékonyak voltak a lépből, a májból és a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számának a csökkentésére a caspofungin iránt érzékeny és mérsékelten érzékeny izolátummal fertőzött egerekben. Érdekes módon *in vivo* paradox hatást tapasztaltak a napi 10

mg/kg anidulafunginnal történő kezelés és a caspofungin iránt érzékeny izolátum esetén (azaz, hatástalan volt a belső szervekből kitenyészett élő gombasejtek számának a csökkentésére a kontrollhoz képest), illetve sem a caspofungin, sem pedig az anidulafungin nem volt hatékony a caspofungin iránt rezisztens izolátumok ellen.

Korábbi munkánkban, átmenetileg neutropéniássá tett egerekkel dolgoztunk, és már a napi 2 mg/kg caspofungin dózisok szignifikánsan csökkentették a vesékből kitenyészett gombák számát a kontrollhoz képest *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* esetén, de csak a napi 5 mg/kg volt hatékony a *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumok ellen (Szilágyi és mtsai. 2012 május.). Ezek az eredmények megerősítették, hogy a caspofungin iránti érzékenységekben különbség van a „psilosis” csoport tagjai között (Gomez-Lopez és mtsai. 2008, Cantón és mtsai. 2010). A csoport mindhárom tagja esetén a kontroll egerekből 10^4 - 10^5 CFU/ml volt a kitenyészett élő gombasejtek száma, jelezve, hogy a virulenciájuk csekély.

Sprenghini és munkatársai (2012) szérumban meghatározták a „psilosis” csoport mindhárom tagja esetén a MIC értékeket és az idő-ölés görbéket is mindhárom echinocandinra nézve. Ahogy várható volt 50% szérumban a MIC értékek jelentős növekedését tapasztalták mindhárom echinocandin esetén. Leghatékonyabb a caspofungin volt 32 mg/l koncentráción, de csak a *C. metapsilosis* izolátumok ellen. *In vivo* szintén csak a caspofungin (napi 5 és 10 mg/kg) mutatott hatékonyságot a „psilosis” csoport mindhárom tagja ellen.

Saját munkánk eredményei nagyon hasonlóak Sprenghini és munkatársai (2012) eredményeihez, bár mi csak a caspofungin *in vitro* és *in vivo* aktivitását vizsgáltuk a „psilosis” csoport tagjai ellen. A caspofungin *in vitro* aktivitása 50% szérumban csökkent, ahogy a MIC értékeket és az idő-ölés görbék eredményét megvizsgáljuk (3. táblázat). A szérumban kapott eredmények a klinikailag elérhető caspofungin koncentrációknál elsősorban a *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumok esetén teszik kérdésessé a caspofungin *in vivo* hatékonyságát, bár a napi 4 mg/kg-os dózisoknál egérben 16-18,4 mg/l C_{max} értékeket lehet mérni (Flattery és mtsai. 2011, Migoya és mtsai. 2011, Stone és mtsai. 2002). A napi 5 mg/kg dózis azonban mindkét izolátumnál hatékony volt (embernél ez napi 70 mg-os dózissal felel meg, Kiegészítő táblázatok 1/B). Első *in vivo* kísérleti elrendezésünk megerősíti azokat az eredményeket, amelyek alapján a „psilosis” csoport tagjai ellen a caspofungin még neutropéniás állapotban is hatékony lehet (Stone és mtsai. 2002, Migoya és mtsai. 2011, Betts

és mtsai. 2009, Gumbo 2007, Andes és mtsai. 2010, Louie és mtsai. 2005, Flattery és mtsai. 2011 Sprenghini és mtsai. 2012).

Második *in vivo* kísérleti elrendezésünkben az egyszeri, nagy dózisú caspofungin hatékonyságát vizsgálva, megjegyzést érdemel, hogy a napi dózisok hatékonysága eltérő lehet ugyanazon izolátumoknál, az első *in vivo* kísérlethez képest. Ez részben annak köszönhető, hogy ezek a kísérletek más időpontban lettek elvégezve, másrészt a statisztikai összehasonlításnál az is számít, hogy hány kezelési csoportot alkalmazunk. Így az első *in vivo* kísérlet sorozatnál csak 3, míg a másodiknál 4 és hat között volt a kezelt csoportok száma.

Eredményeink jól korrelálnak a nemzetközi irodalomban fellelhető korábbi *in vitro* és *in vivo* eredményekkel, azaz a caspofungin a *C. metapsilosis* izolátumok ellen a leghatékonyabb (Tavanti és mtsai. 2007, Lockhart és mtsai. 2008, Andes és mtsai. 2010, Orsi és mtsai. 2010). A legfontosabb eredmény, azonban az, hogy ugyanolyan összdózis esetén az egyszeri, nagy dózisban adagolt caspofungin hatékonyabb lehet, mint a naponta adagolt, kisebb dózisú terápia. Ennek oka a következő lehet:

Az echinocandinok egyedi farmakokinetikája lehetővé teszi, hogy a belső szervek mintegy echinocandin rezervoárokként működjenek az intravénás kezelés után. Louie és munkatársai (2005) kimutatták, hogy a szövetekből a vérbe visszaáramló caspofunginnak fontos szerepe van a tartósan magas szérum echinocandin szint biztosításában. Annak ellenére, hogy a caspofungin nagymértékben fehérjékhez kötődik a szérumban, a klinikai hatékonyságban nemcsak a vér szérumszintjének, de a szövetekben megtalálható, akár kötött formában lévő caspofunginnak van a legfontosabb szerepe. (Louie és munkatársai, 2005). A kórokozók eliminációja szempontjából ez nagyon fontos, hiszen a különböző kórokozók nemcsak a vérben vannak jelen, hanem a vérből bármelyik szervbe beléphetnek, disszeminált fertőzést idézve elő, ami sokkal súlyosabb mintha a kórokozó csak a vérben lenne jelen. Ezért, fontos, hogy a szövetekben is nagy koncentrációban legyen jelen a gyógyszer. Egyszeri, nagy dózisú kezelés esetén a C_{max} értéke magasabb lesz, illetve a görbe alatti terület (ami az összdózist reprezentálja) sokkal hamarabb kialakul (Gumbo és mtsai. 2007, Andes és mtsai. 2010). Mivel ötnapos kezelésünk esetén a görbe alatti terület (AUC) kialakításához a negyedik illetve ötödik alkalommal adagolt kisebb, napi dózisok nem biztos, hogy teljes mértékben hozzá tudnak járulni, ezért lehet előnyösebb az egyszeri, nagy dózisú caspofungin a „psilosis” csoport tagjai ellen ugyanolyan összdózis esetén a kisebb, napi dózissal összehasonlítva.

Klinikai hatékonysága az egyszeri, nagy dózisú echinocandin terápiának kevésbé ismert. A néhány fellelhető kézirat ebben a témában döntően az echinocandinok profilaktikus alkalmazásáról szólnak, és az egyszeri nagy dózisú echinocandin terápia ugyanolyan klinikai hatékonyságot mutatott, mint a napi kisebb dózisú terápia (Mehta és mtsai. 2010, Buell és mtsai. 2005).

Az invazív candidiasis célzott, illetve 'vak' terápiájában az echinocandinoknak van jelenleg a legnagyobb szerepe (Bruyère és mtsai. 2014, Kollef és mtsai. 2012, Pappas és mtsai. 2009). A klinikai tünetek és az anamnézis alapján fel kell, hogy merüljön az esetleges gombafertőzés gyanúja a nagy rizikó faktorral rendelkező egyének esetén, így a megfelelő mintavételek után (vér, torok, sebváladék stb.) be kell indítani a fluconazonon, vagy valamelyik echinocandinon alapuló terápiát (Pappas és mtsai. 2009, Pfaller és mtsai. 2012 jan.). Az echinocandinok kitűnő *in vivo* hatékonysága gyakorlatilag az összes *Candida* faj ellen, illetve a mellékhatások csekély száma lehetővé teszi az egyszeri, nagy dózisú, vagy a naponta nagyobb dózisban történő adagolást (Bennett 2006, Buell és mtsai. 2005, Kett és mtsai. 2011, Mehta és mtsai. 2010).

Bár az echinocandinok nem az elsőként ajánlott szerek *C. parapsilosis sensu stricto* ellen, a legújabb ajánlások a 'vak' terápia során adott echinocandin terápia folytatását javasolják, ha a beteg klinikailag javult (Bruyère és mtsai. 2014, Pfaller és mtsai. 2012 dec.). Ezért, fontos, hogy a „psilosis” csoport esetén is megfelelő *in vitro* és *in vivo* kísérletek álljanak rendelkezésre az echinocandin terápia hatékonyságának a megjóslására. Az echinocandinok kitűnő klinikai hatékonysága ismert *C. parapsilosis sensu stricto* ellen (Pfaller és mtsai. 2008 jan., Pfaller és mtsai. 2012 dec., Walsh és mtsai. 2013), bár az irodalomban több, az echinocandin kezelés során jelentkező, ún. áttörésszerű candidemia is ismert (Pfeiffer és mtsai. 2010).

Munkánkban összehasonlítottuk a caspofungin *in vitro* aktivitását RPMI-1640 és 50% szérumban jelenlétében 4 klinikailag fontos faj ellen. A MIC értékek növekedése 50% szérumban 2-32-szeres volt csupán, a várt 256-512-szeres MIC érték emelkedéshez képest a 4 faj esetén (Paderu és mtsai. 2007, Garcia-Effron és mtsai. 2011, Odabasi és mtsai. 2007), jelezve, hogy a fehérjékhez kötött caspofunginnak van aktivitása. Hasonló eredményeket kaptunk az idő-ölés görbék esetén is. *In vivo* kísérleteink jó korrelációt mutattak az *in vitro* kapott eredményekkel, hiszen neutropéniás egérmodellünkben mindkét kísérleti elrendezésben a *C.*

albicans illetve a „psilosis” csoport tagjai közül a *C. metapsilosis* ellen volt a leghatékonyabb a caspofungin. *In vivo*, a *C. parapsilosis sensu stricto* izolátumok ellen nagyobb caspofungin dózisok voltak szükségesek a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számának a statisztikailag is szignifikáns csökkentéséhez. Az egyszeri, nagydózisú caspofungin alkalmazása nem volt rosszabb ugyanolyan összdózis esetén, a naponta, kisebb dózisban, 5 napon át adagolt caspofungin terápiához képest a 4 vizsgált faj ellen, bár a vesék csíramentesítését egyik terápiás módszerrel sem sikerült elérni. Homozigóta mutációval rendelkező *C. albicans* ellen viszont emelt dózisok sem hatékonyak. További vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy az egyszeri, nagydózisú echinocandin terápiát érdemes-e alkalmazni candidemiában szenvedő betegek kezelésére.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az echinocandin antifungális szerek az utóbbi években az elsőként választandó antifungális szerekké váltak az invazív *Candida* fertőzések kezelésében. A nemzetközi irodalomban ellentmondásos adatok álltak rendelkezésre az echinocandinok *in vivo* hatékonyságát illetően a növekvő gyakorisággal előforduló *Candida parapsilosis sensu stricto* ellen. Ráadásul, a *Candida orthopsilosis* és a *Candida metapsilosis* fajok ellen adatok nem is álltak rendelkezésre az echinocandinok hatékonyságára vonatkozólag. Ezért meghatároztuk a caspofungin *in vitro* és *in vivo* aktivitását a „psilosis” csoportba tartozó három faj és a legvirulensebb faj, a *C. albicans* ellen.

A caspofungin *in vitro* aktivitásának a 2-32-szeres csökkenését tapasztaltuk RPMI-1640 +50% humán szérumban a standard RPMI-1640 tesztközeghez képest, a MIC értékek emelkedése alapján. A MIC meghatározás eredményeit az idő-ölés görbék felvétele során kapott értékek is megerősítették. Tartósan neutropéniában szenvedő egerek esetén már a napi 1 mg/kg caspofungin is hatékony volt *C. albicans*, a napi 2 mg/kg a *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis*, míg a napi 5 mg/kg a *Candida parapsilosis sensu stricto* izolátumok ellen. *C. albicans* esetén az egyszeri 5, 10 és 15 mg/kg caspofungin dózisok hatékonysága nem volt rosszabb a napi 1, 2 és 3 mg/kg dózishoz képest, de a caspofungin rezisztens izolátum esetén a napi 16 mg/kg, és az egyszeri 80 mg/kg dózisok hatástalanok voltak. *Candida parapsilosis sensu stricto* esetén az egyszeri 15 és 20 mg/kg-os, illetve a napi 4 mg/kg dózisok hatékonyak voltak. *C. orthopsilosis* ellen az egyszeri 10 és 15 mg/kg-os dózisok és a napi 3 mg/kg dózis, míg a *C. metapsilosis* ellen az egyszeri 5, 10 és 15 mg/kg-os dózisok illetve a napi 2 és 3 mg/kg dózisok statisztikailag szignifikáns módon csökkentették a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számát. A vesék csírámentesítését azonban, egyik terápiás stratégiával sem sikerült elérni.

Korábbi, *C. albicans*-ra vonatkozó ismereteinket megerősítve, az egyszeri, nagy dózisú caspofungin *in vivo* hatékonysága nem rosszabb, mint az ugyanolyan összdózisban adagolt kisebb, napi dózisokban adott caspofungin. Bár a „psilosis” csoport esetén az egyszeri, nagy dózisú caspofungin többször hatékonyabb volt, mint a napi kisebb dózisok (ugyanolyan összdózis esetén), további vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy az egyszeri,

nagy dózisú echinocandin terápiát érdemes-e alkalmazni candidemiában szenvedő betegek kezelésére.

Summary

Recent years, echinocandins have become the first choice in the treatment of invasive *Candida* infections because of epidemiological changes and the resistance of antifungal agents have been increasing. There were controversial information of *in vivo* effectiveness of echinocandins as *C. parapsilosis sensu stricto* occurred increasing frequency. Furthermore, there are no information about effectiveness of echinocandins against *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* species. Therefore, the first aim of this study was to determine *in vivo* and *in vitro* efficacy of caspofungin against to the medically important „psilosis” group and *C. albicans*.

According to this study, the ratios of MICs in RPMI-1640 with and without 50% human serum varied from 2 to 32. The time-kill curves confirmed the results of MICs determinations. In case of neutropenic mice, 1mg/kg caspofungin daily dose was effective against *C.albicans*, 2 mg/kg caspofungin was efficacious against *C.orthopshilosis* and *C.metapsilosis* while 5mg/kg caspofungin was efficient *C.parapsilosis sensu stricto*. In case of *C. albicans* the effectiveness of single 5, 10 and 15 mg/kg doses were similar to 1, 2 and 3 mg/kg daily doses, but the resistant isolatum of caspofungin the daily 16 mg/kg and single 80 mg/kg doses were totally ineffective. 15 and 20 mg/kg single and 4 mg/kg caspofungin daily doses were effective against *C. parapsilosis sensu stricto*. 10 and 15 mg/kg single and 3 mg/kg daily doses caspofungin against *C. orthopsilosis*, while 5, 10 and 15 mg/kg single and 2 and 3 mg/kg daily doses caspofungin against *C. metapsilosis* significantly decreased the fungi in the kidney burden tissue.

The eradication of the fungi in the kidneys was ineffective with our therapeutically strategies. In accordance with the previous work, *in vivo* effectiveness of the single higher dose caspofungin was similar to cumulative the lower daily doses. However, the single higher dose caspofungin was more effective than cumulative the lower daily doses in case of „psilosis” group. Further studies will be needed to validate that single larger echinocandin doses possess the therapeutic benefit over the traditional smaller daily doses in the treatment of candidaemia.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom elsősorban témavezetőmnek, dr. Majoros Lászlónak, hogy lehetőséget biztosított doktori munkám elvégzésére, valamint hasznos tanácsaival elősegítette tudományos fejlődésemet.

Köszönettel tartozom dr. Kónya József intézetvezetőnek, hogy engedélyezte tudományos munkám elvégzését a Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetében.

Külön köszönetemet szeretném kifejezni Orosz- Tóth Katalinnak az egerek oltását, valamint Hartmann Zsoltnak a táptalajkonyhán végzett kiváló munkáját.

Köszönet illeti még dr. Kardos Gábort és dr. Gesztelyi Rudolfot, akik hasznos tanácsokkal segítettek disszertációm elkészítését.

Továbbá köszönettel tartozom Domán Mariannak és Kovács Renátónak a támogató segítségért.

Hálával tartozom családomnak, barátaimnak a kitartó támogatásért.

Irodalomjegyzék

- Albrecht A, Felk A, Pichova I, Naglik JR, Schaller M, de Groot P, Maccallum D, Odds FC, Schäfer W, Klis F, Monod M, Hube B. 2006. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and hostpathogen interactions. J. Biol. Chem. 281, 688–694.
- Andes D, Diekema DJ, Pfaller MA, Bohrmuller J, Marchillo K, Lepak A. 2010. In vivo comparison of the pharmacodynamic targets for echinocandin drugs against *Candida* species. Antimicrob Agents Chemother. Jun; 54(6):2497-506.
- Arendrup M, Horn T, Frimodt-Møller N. 2002 In vivo pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. Infection. Oct;30(5):286-91.
- Arendrup MC, Rodriguez-Tudela JL, Park S, Garcia-Effron G, Delmas G, Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Perlin DS. 2011. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* spp. Using EUCAST EDef 7.1 and CLSI M27-A3 standard procedures: analysis of the influence of bovine serum albumin supplementation, storage time, and drug lots. Antimicrob Agents Chemother. Apr; 55(4):1580-7.
- Axner-Elings M, Botero-Kleiven S, Jensen RH, Arendrup MC. 2011. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* isolates collected during a 1-year period in Sweden. J Clin Microbiol. Jul; 49(7):2516-21.
- Bal AM. 2010. The echinocandins: three useful choices or three too many? Int J Antimicrob Agents. 35(1):13-8.
- Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Della Vittoria A, Arzeni D, Manso E, Scalise G. 2006. Effects of caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 50(8):2719-27.
- Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Giannini D, Scalise G. 2007. Caspofungin in combination with amphotericin B against *Candida parapsilosis*. Antimicrob Agents Chemother. 51(3):941-5.

Bayegan S, Szilágyi J, Kemény-Beke Á, Földi R, Kardos G, Gesztelyi R, Juhasz B, Adnan A, Majoros L. 2011. 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):107-9.

Ben-Ami R, Garcia-Effron G, Lewis RE, Gamarra S, Leventakos K, Perlin DS, Kontoyiannis DP. 2011. Fitness and virulence costs of *Candida albicans* FKS1 hot spot mutations associated with echinocandin resistance. *J Infect Dis.* Aug 15; 204(4):626-35.

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

Betts RF, Nucci M, Talwar D, Gareca M, Queiroz-Telles F, Bedimo RJ, Herbrecht R, Ruiz-Palacios G, Young JA, Baddley JW, Strohmaier KM, Tucker KA, Taylor AF, Kartsonis NA; Caspofungin High-Dose Study Group. 2009. A Multicenter, double-blind trial of a high-dose caspofungin treatment regimen versus a standard caspofungin treatment regimen for adult patients with invasive candidiasis. *Clin Infect Dis.* Jun 15; 48(12):1676-84.

Bormann AM, Morrison VA. 2009. Review of the pharmacology and clinical studies of micafungin. *Drug Des Devel Ther.* 29;3:295-302.

Bruyère R, Quenot JP, Prin S, Dalle F, Vigneron C, Aho S, Leon C, Charles PE. 2014. Empirical antifungal therapy with an echinocandin in critically-ill patients: prospective evaluation of a pragmatic *Candida* score-based strategy in one medical ICU. *BMC Infect Dis.* Jul 11;14(1):385.

Buell D, Kovada L, Drake T, Fisco C. 2005. Alternative day dosing of micafungin in the treatment of esophageal candidiasis. 47th Annual conference of American Society of Hematology. abstr. 719.

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

Cantón E, 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. 2011. 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.* 55(12):5590-6.

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

Chen C.-A Sharon., Monica A. Slavin and Tania C. Sorrell. 2011. Echinocandin Antifungal Drugs in Fungal Infections A Comparison. *Drugs.* 71(1):11-41.

Choi HK, Jeong SJ, Lee HS, Chin BS, Choi SH, Han SH, Kim MS, Kim CO, Choi JY, Song YG, Kim JM. 2009. Blood stream infections by *Candida glabrata* and *Candida krusei*: a single-center experience. *Korean J Intern Med.* 24(3):263-9.

CLSI. 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. Document M27-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

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

De Luca C, Guglielminetti M, Ferrario A, Calabr M, Casari E. 2012. Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. *New Microbiol.* 35: 459-468.

Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Raoux D, Hoinard D, Dromer F, Dannaoui E; European Committee on Antibiotic .2008. Mutations in the *fkp1* gene in *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* correlate with elevated caspofungin MICs uncovered in AM3 medium using the method of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother.* Sep;52(9):3092-8.

Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M. 2012. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 73(1):45-8.

Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Winokur PL, Gales AC, Sader HS, Kugler K, Beach M. 1999. Survey of bloodstream infections due to gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997. *Clin Infect Dis.* Sep;29(3):595-607.

Dimopoulou D, Hamilos G, Tzardi M, Lewis RE, Samonis G, Kontoyiannis DP. 2014. Anidulafungin versus caspofungin in a mouse model of candidiasis caused by anidulafungin-susceptible *Candida parapsilosis* isolates with different degrees of caspofungin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(1):229-36.

Eksi F, Gayyurhan ED, Balci I. 2013. In vitro susceptibility of *Candida* species to four antifungal agents assessed by the reference broth microdilution method *Scientific World Journal.* Oct 22;2013:236903.

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

Flevari A, Theodorakopoulou M, Velegraki A, Armaganidis A, Dimopoulos G. 2013. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. *Clin Interv Aging.* ;8:1199-208.

García-Agudo L, García-Martos P, Martos-Cañadas J, Aznar-Marín P, Marín-Casanova P, Rodríguez-Iglesias M. 2012. Evaluation of the Sensititre Yeast One microdilution method for susceptibility testing of *Candida* species to anidulafungin, caspofungin, and micafungin. *Rev Esp Quimioter.* Dec; 25(4):256-60.

Garcia-Effron G, Canton E, Pemán J, Dilger A, Romá E, Perlin DS. 2012. Epidemiology and echinocandin susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu lato species isolated from bloodstream infections at a Spanish university hospital. *J Antimicrob Chemother.* 67(11):2739-48.

Garcia-Effron G, Katiyar SK, Park S, Edlind TD, Perlin DS. 2008. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*,

and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(7):2305-12.

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

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

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

Ghannoum, MA. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 122–143.

Glöckner A., Steinbach A., Vehreschild JJ., Cornely OA. 2008. Treatment of invasive candidiasis with echinocandins. *Mycosis.* 52: 476-486.

Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M; Barcelona Candidemia Project Study Group. 2008. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* Apr;52 (4):1506-9.

Goodwin ML, Drew RH. 2008. Antifungal serum concentration monitoring: an update. *J Antimicrob Chemother.* Jan; 61(1):17-25.

Grubb SE, Murdoch C, Sudbery PE, Saville SP, Lopez-Ribot JL, Thornhill MH. 2008. *Candida albicans*-endothelial cell interactions: a key step in the pathogenesis of systemic candidiasis. *Infect Immun.* 76(10):4370-7.

Gumbo T. 2007. Impact of pharmacodynamics and pharmacokinetics on echinocandin dosing strategies. *Curr Opin Infect Dis.* Dec; 20(6):587-91.

Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, Marr KA, Pfaller MA, Chang CH, Webster KM. 2009. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019

patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. Clin Infect Dis. 48(12):1695-703.

Howard SJ, Livermore J, Sharp A, Goodwin J, Gregson L, Alastruey-Izquierdo A, Perlin DS, Warn PA, Hope WW. 2011. Pharmacodynamics of echinocandins against *Candida glabrata*: requirement for dosage escalation to achieve maximal antifungal activity in neutropenic hosts. Antimicrob Agents Chemother. 55(10):4880-7.

Ishikawa J., Tetsuo Maeda, Itaru Matsumura, Masato Yasumi, Hidetoshi Ujiie, Hiroaki Masaie, Tsuyoshi Nakazawa, Nobuo Mochizuki, Satoshi Kishino, and Yuzuru Kanakura. 2009. Antifungal Activity of Micafungin in Serum Antimicrob Agents Chemother. Oct ; 53(10): 4559–4562.

Jawetz, Melnick, Adelberg's, Medical microbiology 2004 The McGraw-Hill Companies

Jiménez-Ortigosa C, Paderu P, Motyl MR, Perlin DS. 2014. Enfumafungin derivative MK-3118 shows increased in vitro potency against clinical echinocandin-resistant *Candida* Species and *Aspergillus* species isolates. Antimicrob Agents Chemother. 58(2):1248-51.

Kang J, Sickbert-Bennett EE, Brown VM, Weber DJ, Rutala WA. 2014. Changes in the incidence of health care-associated pathogens at a university hospital from 2005 to 2011. Am J Infect Control. Jul;42(7):770-5.

Kett DH, Shorr AF, Reboli AC, Reisman AL, Biswas P, Schlamm HT. 2011. Anidulafungin compared with fluconazole in severely ill patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: support for the 2009 IDSA treatment guidelines for candidiasis. Crit Care. 15(5):R253.

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

Kocsubé S, Tóth M, Vágvölgyi C, Dóczy I, Pesti M, Pócsi I, Szabó J, Varga J. 2007. Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis* sensu lato in Hungary. J Med Microbiol. Feb; 56(Pt 2):190-5.

Kollef M, Micek S, Hampton N, Doherty JA, Kumar A. 2012. Septic shock attributed to *Candida* infection: importance of empiric therapy and source control. *Clin Infect Dis.* Jun;54(12):1739-46.

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

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

Liu Y, Filler SG. 2011. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot Cell.* 10(2):168-73.

Lockhart SR, Abramson MA, Beekmann SE, Gallagher G, Riedel S, Diekema DJ, Quinn JP, Doern GV. 2007. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. *J Clin Microbiol.* Oct;45(10):3352-9.

Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. 2008. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol.* 46(8):2659-64.

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

Mehta PA, Vinks AA, Filipovich A, Bleesing J, Jodele S, Jordan MB, Marsh R, Tarin R, Edwards S, Fearing D, Lawrence J, Davies SM. 2010. Alternate-day micafungin antifungal prophylaxis in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a pharmacokinetic study. *Biol Blood Marrow Transplant.* Oct;16(10):1458-62.

Melo AS, Colombo AL, Arthington-Skaggs BA. 2007. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Sep;51(9):3081-8.

- Migoya EM, Mistry GC, Stone JA, Comisar W, Sun P, Norcross A, Bi S, Winchell GA, Ghosh K, Uemera N, Deutsch PJ, Wagner JA .2011. Safety and pharmacokinetics of higher doses of caspofungin in healthy adult participants. *J Clin Pharmacol.* Feb; 51(2):202-11.
- Mishra NN, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta DK, Singh R. 2007. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 54(3):201-35.
- Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. 2003. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67(3):400-28
- Naglik JR, Newport G, White TC, Fernandes-Naglik LL, Greenspan JS, Greenspan D, Sweet SP, Challacombe SJ, Agabian N. 1999. In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infect. Immun.* 67(5): 2482–2490.
- Nantel A, Dignard D, Bachewich C, H Marcus D, Marcil A, Bouin AP, Sensen CW, Hogues H, van het Hoog M, Gordon P, Rigby T, Benoit F, Tessier DC, Thomas DY, Whiteway M. 2002. Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Mol. Biol. Cell.* 13(10): 3452–3465.
- Németh T, Tóth A, Szenzenstein J, Horváth P, Nosanchuk JD, Grózer Z, Tóth R, Papp C, Hamari Z, Vágvolgyi C, Gácsér A. 2013. Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis* sensu lato species. *PLoS One.* Jul 9;8(7):e68704.
- Odabasi Z, Paetznick V, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L. 2007. Effects of serum on in vitro susceptibility testing of echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(11):4214-6.
- Odds F.C., Mary F. Hanson, Amanda D. Davidson, Mette D. Jacobsen, Pauline Wright, Julie A. Whyte, Neil A. R. Gow, and Brian L. Jones. 2007. One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland. *J Med Microbiol.* Aug ; 56(Pt 8): 1066–1075.
- Orsi CF, Colombari B, Blasi E. 2010. *Candida metapsilosis* as the least virulent member of the 'C. parapsilosis' complex. *Med Mycol.* Dec;48(8):1024-33.
- Paderu P, Garcia-Effron G, Balashov S, Delmas G, Park S, Perlin DS. 2007. Serum differentially alters the antifungal properties of echinocandin drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(6):2253-6.

- Pál Tibor Az orvosi mikrobiológia tankönyve. 2012. Medicina kiadó. Budapest
- Papon N, Courdavault V, Clastre M, Bennett RJ. 2013. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS Pathog.* ;9 (9):e1003550.
- 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; 2009. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 48, 503-535. 294
- Pappas PG, Rotstein CM, Betts RF, Nucci M, Talwar D, De Waele JJ, Vazquez JA, Dupont BF, Horn DL, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Suh B, Digumarti R, Wu C, Kovanda LL, Arnold LJ, Buell DN. 2007. Micafungin versus caspofungin for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis.* Oct 1;45(7):883-93.
- Perlin DS. 2007. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat.* Jun;10(3):121-30.
- Pfaller M, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier-Kriesche HU, Quan SP, Horn D. 2012. Dec. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004-2008. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 74(4):323-31.
- Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. 2008. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J Clin Microbiol.* Jan;46(1):150-6.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, Arendrup MC, Brown SD, Lockhart SR, Motyl M, Perlin DS; CLSI Subcommittee for Antifungal Testing. 2011. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist Updat.* 14(3):164-76.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, Rodloff A, Fu W, Ling TA; Global Antifungal Surveillance Group. 2010. 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.* Apr;48(4):1366-77.

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. 2008 Aug. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. *J Clin Microbiol.* 46(8):2620-9.

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

Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, Jones RN, Castanheira M. 2013. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance. *J Clin Microbiol.* Aug;51(8):2571-81.

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

Pfeiffer CD, Garcia-Effron G, Zaas AK, Perfect JR, Perlin DS, Alexander BD. 2010. Breakthrough invasive candidiasis in patients on micafungin. *J Clin Microbiol.* Jul;48(7):2373-80. doi: 10.1128/JCM.02390-09. Epub 2010 Apr 26.

Pittet D, Li N, Woolson RF, Wenzel RP. 1997. Microbiological factors influencing the outcome of nosocomial bloodstream infections: a 6-year validated, population-based model. *Clin Infect Dis.* Jun;24(6):1068-78.

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

Prandini TH, Theodoro RC, Bruder-Nascimento AC, Scheel CM, Bagagli E. 2013. Analysis of inteins in the *Candida parapsilosis* complex for simple and accurate species identification. *J Clin Microbiol.* Sep;51(9):2830-6.

Shields RK, Nguyen MH, Press EG, Updike CL, Clancy CJ. 2013. Anidulafungin and micafungin MIC breakpoints are superior to that of caspofungin for identifying FKS mutant *Candida glabrata* strains and Echinocandin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* Dec;57(12):6361-5.

Shorr AF, Wu C, Kothari S. 2011. Outcomes with micafungin in patients with candidaemia or invasive candidiasis due to *Candida glabrata* and *Candida krusei*. *J Antimicrob Chemother.* Feb;66(2):375-80.

Slater JL, Howard SJ, Sharp A, Goodwin J, Gregson LM, Alastruey-Izquierdo A, Arendrup MC, Warn PA, Perlin DS, Hope WW. 2011. Disseminated Candidiasis caused by *Candida albicans* with amino acid substitutions in Fks1 at position Ser645 cannot be successfully treated with micafungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(7): 3075-83.

Spreghini E, Orlando F, Sanguinetti M, Posteraro B, Giannini D, Manso E, Barchiesi F. 2012. Comparative effects of micafungin, caspofungin, and anidulafungin against a difficult-to-treat fungal opportunistic pathogen, *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother.* Mar. 56(3): 1215-22.

Spreghini E, Orlando F, Tavanti A, Senesi S, Giannini D, Manso E, Barchiesi F. 2012. In vitro and in vivo effects of echinocandins against *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. *J Antimicrob Chemother.* May. 67: 2195-2202.

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

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. 2009. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 64(3): 283-8.

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

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.

- Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J Clin Microbiol. 43(1): 284-92.
- Tavanti A., Lambert A. M. Hensgens, Emilia Ghelardi, Mario Campa, and Sonia Senesi. 2007. 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. May; 45 (5): 1455–1462.
- Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. 2011. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. Eukaryot Cell. 2011 Sep;10(9):1173-82.
- Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. 2008. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. Clin Microbiol Rev. Oct;21(4):606-25.
- van Asbeck E, Clemons KV, Martinez M, Tong AJ, Stevens DA. 2008. Significant differences in drug susceptibility among species in the *Candida parapsilosis* group. Diagn Microbiol Infect Dis. Sep;62(1): 106-9.
- Varga I., Sóczó G., Kardos G., Borbély A., Szabó Z., Kemény-Beke A., Majoros L. 2008. Comparison of killing activity of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. J Antimicrob Chemother. 62(6): 1466-1468.
- Walsh TJ, Gamaletsou MN. 2013. Treatment of fungal disease in the setting of neutropenia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2013:423-7.
- Wiederhold N. P., Jodi L. Grabinski, Guillermo Garcia-Effron, David S. Perlin, and Samuel A. Lee. 2008. Pyrosequencing To Detect Mutations in *FKS1* That Confer Reduced Echinocandin Susceptibility in *Candida albicans* Antimicrob Agents Chemother. Nov; 52 (11): 4145–4148.
- Wiederhold NP, Najvar LK, Bocanegra RA, Kirkpatrick WR, Patterson TF. 2011. Caspofungin dose escalation for invasive candidiasis due to resistant *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. Jul;55(7):3254-60.
- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis. Aug 1;39(3):309-17.

Zakikhany K, Thewes S, Wilson D, Martin R, Albrecht A, Hube B. 2008. From attachment to invasion: infection associated genes of *Candida albicans*. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 49(4): 245-51.

Tárgyszavak/ keywords

caspofungin, „psilosis” csoport, idő-ölés kísérletek, in vivo egérkísérletek

caspofungin, „psilosis” group, time-kill curves, in vivo murine experiments



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Iktatószám: DEENKÉTK/196/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Berényi Réka

Neptun kód: J4KQE8

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Berényi, R.**, Kovács, R., Domán, M., Gesztelyi, R., Kardos, G., Juhász, B., Perlin, D., Majoros, L.:
Efficacy of single large doses of caspofungin in a neutropenic murine model against the
"psilosis" group.
New Microbiol. 37 (3), 355-362, 2014.
IF:1.603 (2013)
2. Földi, R., Kovács, R., Gesztelyi, R., Kardos, G., **Berényi, R.**, Juhász, B., Szilágyi, J., Mózes, J.,
Majoros, L.: Comparison of In Vitro and Vivo Efficacy of Caspofungin Against Candida
parapsilosis, C. orthopsilosis, C. metapsilosis and C. albicans.
Mycopathologia. 174 (4), 311-318, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-012-9554-7>
IF:1.489





További Közlemények

3. Kovács, R., Gesztelyi, R., Perlin, D.S., Kardos, G., Domán, M., **Berényi, R.**, Majoros, L.: Killing rates for caspofungin against *Candida albicans* after brief and continuous caspofungin exposure in the presence and absence of serum.
Mycopathologia. "accepted by publisher" (2014)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-014-9799-4>
IF:1.545 (2013)
4. Kovács, R., Gesztelyi, R., **Berényi, R.**, Domán, M., Kardos, G., Juhász, B., Majoros, L.: Killing rates exerted by caspofungin in 50 % serum and its correlation with in vivo efficacy in a neutropenic murine model against *Candida krusei* and *Candida inconspicua*.
J. Med. Microbiol. 63 (2), 186-194, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.066381-0>
IF:2.266 (2013)
5. Földi, R., Szilágyi, J., Kardos, G., **Berényi, R.**, Kovács, R., Majoros, L.: Effect of 50% human serum on the killing activity of micafungin against eight *Candida* species using time-kill methodology.
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 73 (4), 338-342, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.05.011>
IF:2.26

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,163

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 3,092

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

Debrecen, 2014.08.28



Függelék

Fontosabb előadások, poszterek

Berényi Réka Renáta, Kovács Renátó, Földi Richárd, Gesztelyi Rudolf, Kardos Gábor, Juhász Béla, Majoros László In vitro and in vivo efficacy of caspofungin against fluconazole resistant *Candida krusei* and *C. inconspicua* clinical isolate Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi nagygyűlése, 2012 október 24-26. Keszthely Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica (60)Suppl.1 7-8. o.

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

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

László Majoros, Renátó Kovács, **Réka Berényi**, Judit Szilágyi, Richárd Földi, Rudolf Gesztelyi, Gábor Kardos, Béla Juhász. In vitro and in vivo efficacy of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*. 2nd Joint Workshop of ÖGMM, ÖGACH, ÖGIT & ÖGHMP, 2011. Vienna

Kovács Renátó, **Berényi Réka**, Domán Marianna, Majoros László A caspofungin in vitro hatékonyságának vizsgálata *Candida krusei*, *C. inconspicua* és *C. albicans* klinikai izolátumok ellen Tavaszi Szél Konferencia, 2013 május 31-június 2. Sopron

Kovács Renátó, **Berényi Réka**, Földi Richárd, Gesztelyi Rudolf, Kardos Gábor, Juhász Béla, Majoros László In vitro and in vivo efficacy of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans* Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi

nagygyűlése, 2012. október 24-26. Keszthely Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica (60)Suppl.1 38. o. IF: 0,646

Kovács Renátó, Majoros László, **Berényi Réka**, Szilágyi Judit, Földi Richárd, Gesztelyi Rudolf, Kardos Gábor és Juhász Béla: Caspofungin in vivo és in vitro hatékonyságának összehasonlító vizsgálata *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* és *C. albicans* izolátumok esetén V. Magyar Mikológiai Konferencia 2012. május 23-25. Budapest

Kiegészítő táblázatok 1/A

Faj	Hol és milyen %-ban izolálják
<i>Candida orthopsilosis</i>	Ázsia 11%
	Dél-Amerika 10,9%
	Észak-Amerika 5%
	Amerika Egyesült Államok 4,9%
	Mexikó 10,7%
	Kanada 0%
	Európa, Közel-Kelet 3,5%
<i>Candida metapsilosis</i>	Ázsia 2,6%
	Dél-Amerika 0,7-1,7%
	Észak-Amerika 2,6%

Kiegészítő táblázatok 1/B

Naponta és egyszeri alkalommal adagolt caspofungin által eredményezett farmakokinetikus paraméterek egerek és emberek esetén (Flattery és mtsai. 2011, Migoya és mtsai. 2011, Stone és mtsai. 2002).

Napi dózisok (egér)	AUC _{0-24h} (mg·h/l)	C _{min} (mg/l)	C _{max} (mg/l)
1 mg/kg	53,59-35,49	0,59-0,58	5,04-3,6
2 mg/kg	108,4-73,9	1,0-0,7	10,6-7,0
4 mg/kg	174,8-150-	1,36-1,33	16,8-14,6
8 mg/kg	369,5-311,3	3,86-3,9	38,9-37,9

Napi dózisok (ember)	AUC _{0-14 nap} (mg·h/l)	C _{max} (mg/l)
15 mg	24,37	2,79
35 mg	54,9	5,97
50 mg	86,9	8,74
70/50 mg	100,5	9,94
70 mg	144-175	15,4-14,2
100 mg	219-250	21,5-20,3
150 mg	375	30,4
200 mg	500	40,6

Egyszeri dózis (egér)	AUC _{0-24h} (mg·h/l)	C _{max} (mg/l)
1 mg/kg	25	3,2
5 mg/kg	164	18
20 mg/kg	345	26
80 mg/kg	667	58

Egyszeri dózis (ember)	AUC _{0-24h} (mg·h/l)	C _{max} (mg/l)	C _{átlag} (mg/l)
50 mg	58	7,6	1,59
70 mg	104-135	12,04	1,18-1,71
100 mg	118—152,3	14,03	1,23-1,76
150 mg	227-345	26,6-32,5	2,1-3,9
210 mg	329-427	29-39	3,2-5,5