

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A CASPOFUNGIN DÓZISNÖVELÉS HATÉKONYSÁGÁNAK VIZSGÁLATA *CANDIDA ALBICANS* ÉS *CANDIDA GLABRATA* KLINIKAI IZOLÁTUMOK ELLEN

Domán Marianna

Témavezető: Dr. Majoros László



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2016

Tartalomjegyzék

FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK.....	4
1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1. <i>Candida</i> fajok általános jellemzése, virulencia faktorok szerepe a patogenezisben	7
2.2. A <i>Candida</i> fajok okozta megbetegedések	9
2.3. A <i>Candida</i> fertőzések epidemiológiája.....	10
2.4. Invazív <i>Candida</i> infekciók kezelése.....	12
2.4.1. Echinocandinok	13
2.4.1.1. A <i>Candida</i> fajok érzékenységének meghatározása echinocandinok iránt.....	14
2.4.1.2. Farmakodinámiai tulajdonságok.....	16
2.4.1.3. Caspofungin.....	17
2.4.1.4. Paradox növekedés	18
2.4.1.5. Antifungális szerekkel szembeni rezisztencia	20
2.4.1.6. A humán szérum hatása az echinocandinok farmakodinámiájára	23
3. CÉLKITŰZÉS.....	25
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	26
4.1. A vizsgált izolátumok.....	26
4.2. <i>In vitro</i> érzékenységi vizsgálatok.....	26
4.2.1. Idő-ölés (time-kill) görbék felvétele az antifungális hatás vizsgálatához	27
4.2.2. Az <i>in vitro</i> adatok kiértékelése.....	28
4.3. <i>In vivo</i> kísérletek.....	30
4.3.1. A kísérletben felhasznált egerek.....	30
4.3.2. Oltóanyag készítés és a fertőzés menete.....	30
4.3.3. Antifungális terápia	31
5. EREDMÉNYEK.....	33
5.1. A caspofungin iránti érzékenység meghatározása mikrodilúciós módszer, valamint E-teszt segítségével.....	33
5.2. Az idő-ölés kísérletek eredményei RPMI-1640 és RPMI-1640+50% humán szérum jelenlétében <i>Candida albicans</i> izolátumok ellen.....	35
5.3. A caspofungin ölési rátájának meghatározása <i>Candida albicans</i> izolátumok ellen	39
5.4. A caspofungin <i>in vivo</i> hatékonyságának vizsgálata <i>Candida albicans</i> izolátumok ellen	41
5.5. Az idő-ölés kísérletek eredményei RPMI-1640 és RPMI-1640+50% humán szérum jelenlétében <i>Candida glabrata</i> izolátumok ellen.....	44
5.6. A caspofungin ölési rátájának meghatározása <i>Candida glabrata</i> izolátumok ellen	49
5.7. A caspofungin <i>in vivo</i> hatékonyságának vizsgálata <i>Candida glabrata</i> izolátumok ellen	51
6. MEGBESZÉLÉS	55
7. ÖSSZEFOGLALÁS	62
8. SUMMARY	63
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	64

10. IRODALOMJEGYZÉK.....	65
11. TÁRGYSZAVAK-KEYWORDS.....	78
12. FÜGGELÉK	81

Fontosabb rövidítések

AMB	amphotericin B
ANI	anidulafungin
AUC	area under the curve = koncentráció-idő görbe alatti terület
AUC/MIC	koncentráció-idő görbe alatti terület/ minimális gátló koncentráció
ATCC	American Type Culture Collection
CAS	caspofungin
CFU	colony forming unit = kolóniaképző egység
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
C_{max}	a szérumban mérhető maximális gyógyszerkoncentráció
C_{max}/MIC	a szérumban mérhető maximális gyógyszerkoncentráció/minimális gátló koncentráció
EMA	European Medicines Agency = Európai Gyógyszerügynökség
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	US Food and Drug Administration
FKS1, FKS2	a gombasejtfal szintéziséért felelős β -1,3-D-glükán-szintáz enzimkomplex Fksp alegységét kódoló gének
FLU	fluconazol
K_m	Michaelis-Menten konstans
IC ₅₀	félhatásos gátló koncentráció
MIC	minimal inhibitory concentration = minimális gátló koncentráció
MICA	micafungin
PAFE	postantifungal effect = posztantifungális hatás
PG	paradoxical growth = paradox növekedés
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute Medium - sejtenyésztésre alkalmas táptalaj

1. Bevezetés

A gombák okozta fertőzések incidenciája jelentősen emelkedett az elmúlt évtizedekben, így napjainkban komoly népegészségügyi problémát jelentenek. Évente több mint 300 millió ember szenved valamilyen súlyos gombás fertőzésben, melyekből közel 1,4 millió eset halállal végződik (Perlin 2014). Az esetek túlnyomó részében a *Candida*, *Aspergillus*, valamint a *Cryptococcus* fajok tehetők felelőssé. A CDC (Centers for Diseases Control and Prevention) felmérése szerint a nozokomiális patogének között a *Candida* fajok az ötödik helyen állnak, míg a véráramfertőzéseket tekintve a negyedik leggyakrabban izolálható kórokozók (Yapar 2014, Delaloye és Calandra 2014, Pfaller és Diekema 2007).

Az invazív candidiasis kialakulását számos rizikó faktor idézheti elő, melyek közül kiemelhető a hosszan tartó, széles spektrumú antibiotikum kezelés, valamint a kemoterápiában részesülő betegek tartós neutropeniás állapota (<500 neutrofil granulocita/ μ l). Egy több országot magába foglaló felmérés alapján a candidaemia mortalitása minden kórházi osztályt figyelembe véve 29% volt, azonban az intenzív osztályokon ez az arány elérheti az 50-70%-ot is (Weiss és Timsit 2014, Farmakiotis és mtsai. 2015, Lortholary és mtsai. 2014, Horn és mtsai. 2009, Dimopoulos és mtsai. 2007, Bodey és mtsai. 2002).

Habár a különböző *Candida* fajok prevalenciájában változások figyelhetők meg az elmúlt 20-30 évben, az infekciók 95%-át az alábbi öt faj okozza: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* és a *C. krusei* (Yapar 2014, Pfaller és mtsai. 2011/a). A *C. albicans* napjainkban is a leggyakrabban izolálható humánpatogén sarjadzó gomba, azonban elsősorban a terápiás, illetve a profilaktikus fluconazol (FLU) használat egy jól látható epidemiológiai változást eredményezett a primer FLU rezisztenciával (*C. krusei*) vagy csökkent FLU érzékenységgel (*C. glabrata*) rendelkező non-*albicans* fajok irányába (Lass-Flörl 2009).

Az invazív gombás fertőzések sikeres kezelésének alapja az időben elkezdett, megfelelő antifungális szer alkalmazása. Ezen infekciók kezelésében több mint 40 évig az amphotericin B-nek (AMB) volt meghatározó szerepe. Számos mellékhatásai (főleg a nefrotoxicitása) miatt indokolttá vált a hasonlóan hatékony, de kevesebb mellékhatással bíró új antimikotikumok kifejlesztése. Az 1990-ben bevezetett FLU orálisan is alkalmazható, kiszámítható farmakokinetikával rendelkezik, valamint jó szöveti eloszlást mutat a különböző szervekben. Ideális tulajdonságai miatt hamar a legelterjedtebb antifungális szerré vált a sarjadzó gombák okozta mukózális és szisztémás fertőzések kezelésében (Lewis 2011).

A klinikumban alkalmazható gombaellenes szerek száma csekély. A korábbi szerek esetében felmerülő problémáknak (toxicitás, illetve rezisztencia) köszönhetően a gombák sejtfalszintézisét gátló echinocandinok bevezetése fordulópontot jelentett. Az echinocandinok közül legkorábban a caspofungint (CAS) engedélyezték, mely invazív candidiasis és invazív aspergillosis kezelésére egyaránt alkalmas. A legtöbb *Candida* faj ellen *in vitro* fungicid aktivitást mutat, kedvező farmakokinetikai és farmakodinámiás tulajdonságokkal rendelkezik, ennek következtében jelenleg elsőként választandó szer az invazív candidiasis empirikus terápiájában (Lewis 2011, Chen és mtsai. 2011, Pappas és mtsai. 2016).

Az echinocandinok további előnye, hogy a klinikai hatékonyság növelése érdekében lehetőség van a jelenleg elfogadott alacsony dózisok helyett nagyobb dózisok adagolására. Betts és munkatársai bebizonyították, hogy a CAS esetében akár a 150 mg-os napi dózis is biztonságosan alkalmazható. Mindazonáltal az eddigi klinikai vizsgálatok nem igazolják a nagyobb dózisok jobb hatékonyságát (Betts és mtsai. 2009, Migoya és mtsai. 2011). Érdekes jelenséget lehet megfigyelni az echinocandinok aktivitását vizsgáló *in vitro* kísérletek során. Bizonyos *Candida* fajok (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*) esetén a MIC érték (minimális gátló koncentráció) feletti gyógyszerkoncentrációkon a szer fungisztatikus hatást fejt ki, míg az alacsony koncentrációkon fungicid hatás érvényesül (Vanstraelen és mtsai. 2013). Ez a paradox növekedés a humán szérumban elérhető koncentrációkon is megjelenhet, azonban a klinikai relevanciája egyelőre kérdéses (Shields és mtsai. 2011).

Kísérleteink során idő-ölés módszerrel vizsgáltuk a CAS aktivitását *C. albicans* és *C. glabrata* izolátumok ellen. Ez a módszer pontosabb adatokat nyújt a szer ölé aktivitásának mértékéről, valamint a farmakodinámiás jellemzőiről (Klepser és mtsai. 1998). Nem hagyható figyelmen kívül, hogy az echinocandinok nagymértékben kötődnek a szérumfehérjékhez (96,5-99,8%) (Chen és mtsai. 2011, Garcia-Effron és mtsai. 2011). Ebből adódóan az antifungális érzékenység meghatározásánál érdemes humán szérumot alkalmazni, mely jobban modellezi az *in vivo* környezetben lezajló folyamatokat (Nasar és mtsai. 2013).

Mindezek ismeretében célunk volt megállapítani a CAS ölési aktivitását, valamint az *in vitro* és *in vivo* kísérleteink közötti összefüggések vizsgálatával meghatározni a dózisonövelés hatékonyságát *C. albicans*, valamint *C. glabrata* izolátumok ellen.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. *Candida* fajok általános jellemzése, virulencia faktorok szerepe a patogenezisben

A *Candida* fajok sejtfa egy poliszacharid mátrix, melynek fő szénhidrát alkotóelemei a β -glükán (1,3- β -glükán 40%, 1,6- β -glükán 20%) és a kitin (5%). További fontos strukturális komponens a fehérjékkel asszociált mannóz polimer (glikoproteinek), valamint kis mennyiségben lipidek is megtalálhatók a sejtfaiban (Chaffin és mtsai. 1998, Brown és Catley 1992). A fajok között a komponensek aránya különbözhet, például a *C. glabrata* sejtfaának mannoprotein tartalma 50%-kal magasabb a *C. albicans* sejtfaával összehasonlítva (de Groot és mtsai. 2008). A sejtfaon kívül a gombasejt további jellegzetes eleme a sejtmembránban található ergoszterol (Lewis 2011).

Számos patogén gombafaj képes megváltoztatni a fizikai megjelenési formáját, melynek bizonyítottan szerepe van a virulenciában. Ezek a fő morfológiai típusok *Candida* fajok esetében az élesztő, pszeudohifa és a hifa alak. Az élesztő önálló, ovális sejt, melynél mind bipoláris, mind tengelyirányú sarjadzás megfigyelhető (Thompson és mtsai. 2011). A pszeudohifa képzés során a megnyúlt, ellipszoid alakú sejtek láncszerűen egymáshoz kapcsolódnak. A pszeudohifától eltérően a hifa sejtfa egymással párhuzamos lefutású és a sejteji közötti válaszfalakon (septum) általában pórus található, lehetővé téve a sejtek közötti kommunikációt és anyagáramlást (Yang és mtsai. 2014, Thompson és mtsai. 2011).

A *C. albicans*, *C. dubliniensis* és *C. tropicalis* mindhárom morfológiai formában megtalálható, míg a *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, valamint a *C. parapsilosis* esetében csak az élesztő és a pszeudohifa alak van jelen (Thompson és mtsai. 2011). Habár a *C. glabrata* elsődlegesen élesztő formában növekszik, bizonyos körülmények között (pl. nitrogénhiány) pszeudohifa képzésre is képes (Csank és Haynes 2000).

A különböző környezeti hatások befolyásolhatják a *C. albicans* morfológiáját. Alacsony pH-n (<6) a sejtek élesztő formában vannak jelen, míg a magas pH (>7) hifaképzést indukál. A tápanyaghiány, a szérum vagy az N-acetil-glükózamin jelenléte, valamint a fiziológiás hőmérséklet is a hifaformálásnak kedvez. Ezt az élesztő és hifa közötti morfológiaváltást nevezzük dimorfizmusnak, mely fontos tulajdonság a patogenitás szempontjából (Mayer és mtsai. 2013).

A szervezet sikeres kolonizálásának, valamint a fertőzés kialakításának nélkülözhetetlen része az adhézió. A *Candida* fajoknál ezt a folyamatot leginkább az adhezinek biztosítják a biotikus (sejtek, más mikroorganizmusok) és az abiotikus (katéter) felszínekhez egyaránt. A

C. albicans esetében a legismertebb adhezín csoport az ALS (agglutinin-like sequence) fehérje család, melynek nyolc tagja van (Als1-7 és Als9). Az ALS gének által kódolt fehérjék glikozilfoszfatidilinozitol-kapcsolt sejt felszíni glikoproteinek (Mayer és mtsai. 2013). Az Als proteinek közül kiemelkedő jelentősége van a hifák által termelt Als3-nak, mely biztosítja az epithel és endothel sejtekhez, illetve az extracelluláris mátrix proteinekhez való kötődést (Liu és Filler 2011). A *C. albicans* egy másik fontos adhezínje a szintén hifa-asszociált Hwp1, mely az emlős sejtek transzglutaminázának szubsztrátjaként biztosítja a hifa-sejt kapcsolatot (Brunke és Hube 2013). A *C. glabrata* esetében a fő adhezinek az Epa fehérjék, melyek közül az epithel sejtekhez történő adhéziót elsősorban az Epa1, míg a más sejtekkel való kapcsolatot a többi Epa fehérje biztosítja. Az Epa proteinek változatosak és eltérő expressziós mintázatot mutatnak (pl. biofilm képzés során Epa3, húgyúti infekció esetén Epa6 expresszió) (Juárez-Cepeda és mtsai. 2015).

A fentebb említett adhezinek hozzájárulnak a katétereken, műbillentyűkön és a nyálkahártya felszíneken megjelenő biofilm kialakításához. Ez a gombák által szekretált poliszacharid mátrix rezisztenciát biztosít a legtöbb antifungális szerrel szemben. FLU-lal, itraconazollal és flucitozinnal kezelt *C. albicans* biofilm esetén az 50%-os metabolikus aktivitáscsökkenés eléréséhez szükséges gyógyszerkoncentráció 5-8-szor magasabb volt a planktonikus sejtekhez képest (Douglas 2003). A *C. tropicalis*, a *C. glabrata*, a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* gyakran képeznek biofilmet orvosi eszközökön (Cuéllar-Cruz és mtsai. 2012).

A *C. albicans* esetében a sejtek invázióját két invazín segíti, az Als3 és a hősokk protein 70 családba tartozó Ssa1 (Sun és mtsai. 2010, Mayer és mtsai. 2013). A folyamatban különféle hidrolitikus enzimek (foszfolipázok, lipázok, proteínázok) is részt vesznek (Brunke és Hube 2013). A *C. albicans* fő virulencia faktorai a szekretált aszpartil proteínázok (SAP). A SAP-ok szerepet játszanak az adhézió és invázió folyamatában is, ahol a gomba a felszabadult oligopeptideket és aminosavakat transzporterein keresztül felveszi. Továbbá részt vesznek az immunválasz elkerülésében az immunglobulinok, illetve a komplement fehérjék degradálása által (Naglik és mtsai. 2004). *In vitro* és *in vivo* kísérletek bizonyítják, hogy a SAP gének aktiválása a fertőzés típusától függ. A SAP1-SAP3 gének által kódolt fehérjék a mukózális fertőzések során az invázióban és a szövetkárosodásban, míg a SAP4-SAP6 géntermékek a szisztémás infekcióban vesznek részt (Gauwerky és mtsai. 2009). A *C. glabrata* esetén szekretált aszpartil proteínáz nem találtak, csupán tizenegy élesztő aszpartil proteínáz (yapszin) kódoló gént (YPS). A YPS gének szükségesek a *C. glabrata* túléléséhez a makrofágokban, illetve a sejt falat érő stresszhatások esetén (Kaur és mtsai. 2007).

A *C. glabrata* további érdekessége, hogy haploid genommal rendelkezik, melynek szerepe lehet az antifungális szerekkel szemben viszonylag gyorsan megjelenő rezisztencia kialakulásában (Perlin 2014).

2.2. A *Candida* fajok okozta megbetegedések

A normál flóra tagjaként a *Candida* fajok megtalálhatók a bőrön, a gastrointestinális rendszer és a genitális tájék nyálkahártyáin (López-Martínez 2010). Bizonyos hajlamosító tényezők hatására azonban képesek infekció kialakítására. Ilyen prediszponáló faktor többek között a széles spektrumú antibiotikum használat, alacsony (<1 év) vagy magas (>60 év) életkor, diabetes mellitus, korábbi sebészi beavatkozás, immunszuppresszív terápia, tartós neutropénia, hosszú kórházi tartózkodás (főleg az intenzív osztályokon), *Candida* kolonizáció, katéterhasználat, parenterális táplálás (Arendrup 2013, Sipsas és Kontoyiannis 2012, Méan és mtsai. 2008, Pfaller és Diekema 2007). A fertőzések nagyobb hányada endogén, tehát a beteg valamilyen testtáját kolonizáló organizmusból ered. Ritkábban ugyan, de előfordulhat exogén forrásból származó fertőzés is (kontaminálódott orvosi eszközök, egészségügyi dolgozók keze) (Sims és mtsai. 2005).

A *Candida* infekciók klinikai manifesztációja változatos. Amikor valamilyen átmeneti tényező felborítja az egyensúlyt a normál flóra többi tagja és az adott *Candida* faj között, normál immunrendszerű egyéneknél is kialakulhat candidiasis. Ezek a megbetegedések enyhe lefolyásúak, leggyakoribb megjelenési formái a főként csecsemőket érintő soor vagy szájpenész és a nőket érintő vulvovaginitis. A szájpenész a születés során kialakuló fertőzés eredménye, jellemző tünete a buccalis nyálkahártyán látható fehér felrakódás. A vulvovaginitis a nők körülbelül 75%-át érinti életük során legalább egyszer, valamint köztük 40-50%-ban másodszor is kialakul a fertőzés, melyet leginkább a hüvelyi pH emelkedése segít elő (López-Martínez 2010, Hurley és De Louvois 1979).

A fentebb említett megbetegedésekkel ellentétben súlyosabb lefolyású kórképek a szisztémás vagy invazív *Candida* infekciók. Az invazív candidiasis esetek többsége *Candida* fajok által okozott véráramfertőzés (candidaemia), mely a nozokomiális fertőzések 10-15%-áért felel az Amerikai Egyesült Államokban (Delaloye és Calandra 2014). A fertőzés hematogén szóródásának első jelei lehetnek a chorioretinitis és az endophthalmitis, melyek a candidaemia-s esetek 10-45%-ában előfordulnak (Sims és mtsai. 2005).

A hematogén szóródás következtében disszeminált candidiasis jöhet létre, mely számos szervet érinthet (hasüreg, tüdő, szem, szív, csontrendszer, központi idegrendszer). A leggyakoribb formája a peritonitis, amely posztoperatív infekció, illetve bélperforáció

eredményeként alakul ki. Peritonitisben szenvedő betegek esetén a *Candida* fajok a második leggyakrabban izolálható patogének (Sims és mtsai. 2005, Hasibeder és Halabi 2014). A *Candida* okozta meningitist tünetei alapján nem lehet a bakteriális meningitistől megkülönböztetni. Jellemzője, hogy a liquor mintában a limfociták dominálnak (átlagosan 600 sejt/mm³) (Nguyen és Yu 1995). Légúti mintákból gyakran izolálhatók *Candida* fajok, ennek ellenére az esetek többségében inkább kolonizáló fajként, nem patogénként vannak jelen. A kiválasztó szervrendszer normál körülmények között steril, viszont gyakran előfordul tünetmentes *Candida* kolonizáció. A primer húgyúti candidiasis a beültetett katéterekkel, diabetes-szel, valamint az antibiotikum használatával összefüggő nozokomiális megbetegedés. Emellett a candiduria a disszeminált candidiasis egyik korai manifesztációjaként is megjelenhet, mivel a vese a véráramfertőzés leggyakoribb célszervei között szerepel (Sims és mtsai. 2005, Kauffman és mtsai. 2000).

2.3. A *Candida* fertőzések epidemiológiája

Az invazív gombás fertőzések gyakorisága jelentősen megemelkedett az elmúlt évtizedekben. A leggyakrabban izolálható nozokomiális gomba patogének a *Candida* és az *Aspergillus* fajok, melyek különösen az intenzív osztályokon okoznak magas mortalitást eredményező mikózisokat (Colombo és mtsai. 2014, Delaloye és Calandra 2014). Annak ellenére, hogy több mint 17 *Candida* faj képes invazív candidiasist okozni, az infekciók több mint 90%-áért csupán 5 *Candida* faj felelős (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*) (Pfaller és Diekema 2007, Pfaller és mtsai. 2011/a).

Az egyes *Candida* fajok eloszlása földrészenként, azon belül régióként, valamint betegcsoportonként változó. Az invazív fertőzések kórokozójaként a *C. albicans* még mindig tartja a vezető pozícióját a *Candida* speciesek között az egész világon (Delaloye és Calandra 2014, Pfaller és Diekema 2007, Pfaller és mtsai. 2011/a). Érdekes azonban megjegyezni, hogy a *C. albicans* okozta véráramfertőzések incidenciája az utóbbi években csökkenést mutat (Pfaller és Diekema 2007, Pfaller és mtsai. 2012). Pongrácz és munkatársai által a Semmelweis Egyetemen készített, négy éves (2010-2014) periódust vizsgáló epidemiológiai felmérésben a candidaemia háttérében leggyakrabban a *C. albicans* állt (63%), megelőzve a *C. glabrata*-t (13%) és a *C. parapsilosis*-t (10,2%) (Pongrácz és mtsai. 2015). Hasonló eloszlást figyeltek meg Majoros és munkatársai is 1997 és 2000 között a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrumában, ahol az összes *Candida* fertőzést tekintve legtöbbször *C. albicans*-t és *C. glabrata*-t izoláltak (Majoros és mtsai. 2002). A *C. albicans* gyakran okoz infekciót az újszülött intenzív osztályokon (54,8%), valamint a sebészi

beavatkozáson átesett (nem transzplantált) betegek körében (44,5%). A legfontosabb rizikófaktorok közé sorolható továbbá a diabetes mellitus, perifériás katéter jelenléte és a szteroid terápia. Ezzel szemben ritkábban izolálható hematopoetikus őssejt transzplantált betegek (17,6%), illetve hematológiai betegségben szenvedők esetében (22%) (Pfaller és mtsai. 2012).

Az 1990-es évektől egyre gyakrabban azonosítanak non-*albicans Candida* fajokat kórokozóként (elsősorban *C. glabrata*-t és *C. krusei*-t) a széleskörű FLU használatnak köszönhetően. Amíg 1988-1992 között a *C. albicans*, a *C. tropicalis* és *C. parapsilosis* volt a candidaemia kialakulásának fő oka a hematológiai betegségekben szenvedők körében, addig 1993-2003 között ezt a szerepet a *C. glabrata* (30,6%) és a *C. krusei* (24,2%) töltötte be (Hachem és mtsai. 2008). Az epidemiológiai változásokat tükrözi továbbá, hogy a vérképző rendszeri daganatos betegek, illetve az őssejt transzplantáción átesett betegek esetén az összes eset több mint 50%-át non-*albicans Candida* fajok okozzák (Sipsas és mtsai. 2009).

A *Candida* véráramfertőzéseket tekintve a *C. glabrata* a második leggyakrabban izolálható faj Észak-Amerikában és Európában egyaránt (Pfaller és mtsai. 2011/b, Pfaller és mtsai. 2012, Lass-Flörl 2009). Latin-Amerikában azonban csak a negyedik helyen áll 5,2%-os előfordulási gyakorisággal a *C. albicans* (43,6%), a *C. parapsilosis* (25,6%) és a *C. tropicalis* mögött (17%) (Pfaller és mtsai. 2011/b). Pfaller és munkatársai 2004-2008 között végzett prospektív felmérésében epidemiológiai, antimikotikum felhasználási és mortalitási adatokat vizsgáltak, melyet 25 észak-amerikai orvosi központ bevonásával készítettek el. A felmérés szerint a *C. glabrata* általában idősebb páciensekben (átlag életkor 58 év) okozott candidaemia-t, valamint a betegek 51,9%-a részesült a fertőzést megelőzően valamilyen antifungális kezelésben. Emellett *C. glabrata* infekció esetén szintén jelentős rizikófaktor a cukorbetegség, a perifériás katéter jelenléte és a korábbi szteroid terápia. Kiemelkedő kórokozónak számít továbbá szervtranszplantáltak (38,4%), hematopoetikus őssejt transzplantáltak esetén (32,7%), valamint a tumoros betegek ellátásával foglalkozó centrumokban (Pfaller és mtsai. 2012, Hachem és mtsai. 2008). Fontos megjegyezni, hogy a candidaemia mortalitási aránya magas, mely az intenzív osztályokon *C. glabrata* fertőzés esetén akár az 50-69%-ot is elérheti (Lortholary és mtsai. 2014, Farmakiotis és mtsai. 2015).

A *C. parapsilosis* izolálási gyakorisága 4,2%-ról 7,3%-ra emelkedett 1997 és 2003 között (Pfaller és Diekema 2007). Az emelkedés mértéke Latin-Amerikában a leglátványosabb, ahol 25,6%-át képezte az összes *Candida* véráramfertőzésnek 2008-2009-ben (Pfaller és mtsai. 2011/b). A katétereken és egyéb implantált eszközökön való jó biofilmképző képességének köszönhetően, valamint a kézzel történő terjedése és a kórházi környezetben való

perzisztálása miatt fontos nozokomiális patogénként tartják számon. Főként újszülöttekben okoz fertőzést, ahol a candidaemia 30%-áért felel (felnőttek esetében ez az arány 10-15%) (Pfaller és Diekema 2007, Pappas és mtsai. 2003, Yapar 2014).

A *C. tropicalis* okozta szepszis elsősorban Latin-Amerikában jelentős (20%), míg Észak-Amerikában a candidaemia-s esetek mindössze 7%-át eredményezi (Pfaller és Diekema 2007). Jelentős patogénnek tekintik a hematológiai betegségekben szenvedőknél (15,4%) (Pfaller és mtsai. 2012). Ezekkel a betegségekkel gyakran együtt jár a neutropénia, amely számottevő prediszponáló tényezője a *C. tropicalis* infekciónak (a *C. tropicalis*-szal kolonizált neutropéniás betegek 60-80%-ánál alakul ki invazív fertőzés) (Pfaller és Diekema 2007, Hachem és mtsai. 2008).

Szintén a neutropéniás betegek (51,3%), valamint a vér és csontvelőtranszplantált páciensek körében okoz sok esetben fungaemia-t a *C. krusei*. Habár a *C. krusei* izolálási gyakorisága alacsony (2-4%), a földrajzi eloszlást tekintve Kelet-Európában magasabb prevalenciát tapasztaltak (5,1-7,6%) (Pfaller és Diekema 2007, Pfaller és mtsai. 2012, Pfaller és mtsai. 2008). A faj ritka izolálása ellenére is problémát jelent, mivel Horn és munkatársai az általa okozott candidaemia esetében figyelték meg a legmagasabb mortalitást (52,9%) (Horn és mtsai. 2009).

2.4. Invazív *Candida* infekciók kezelése

A megfelelő antifungális szer kiválasztását nagyban befolyásolja a *Candida* fajok epidemiológiája, érzékenysége, a gyógyszerek farmakokinetikai tulajdonságai, interakciói egyéb hatóanyagokkal, mellékhatásai, valamint a betegek intoleranciája az adott szerrel szemben (De Rosa és mtsai. 2009, Sipsas és Kontoyiannis 2012). Az időben elkezdett terápia az egyik legfontosabb része a hatékony antifungális kezelésnek, illetve a mortalitás csökkentésének. Az optimális terápia megválasztását nehezíti, hogy nem rendelkezünk könnyen elérhető vagy standardizált diagnosztikus eszközökkel, melyek szükségesek a korai azonosításhoz (Ito és mtsai. 2010, Ruhnke 2014).

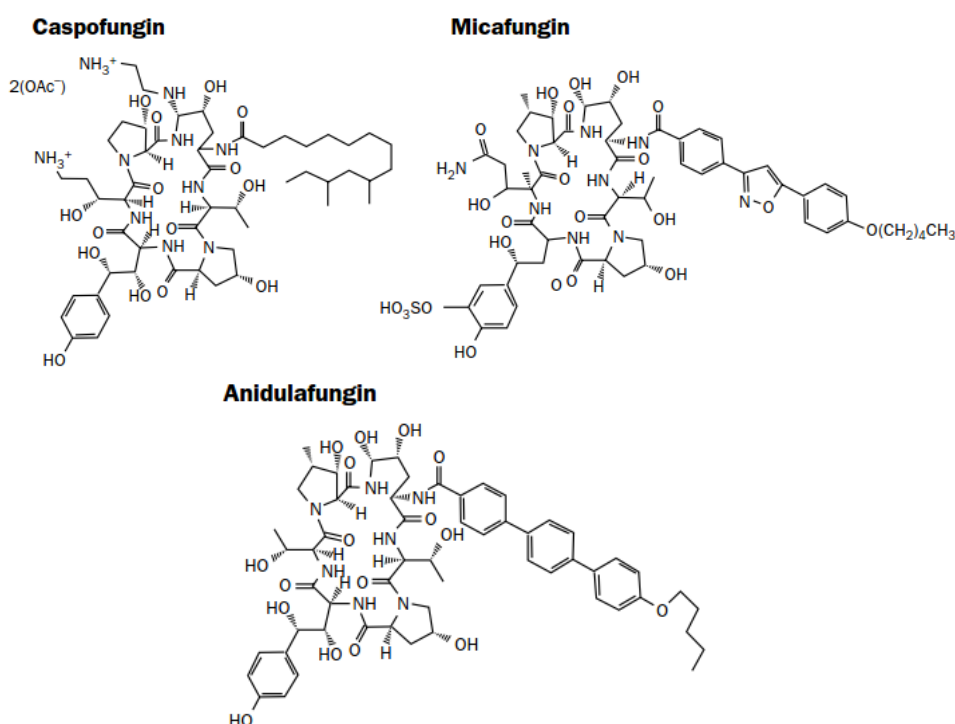
A jelenleg elérhető antifungális szerek közül négy csoport alkalmas szisztémás infekciók kezelésére: a poliének (amphotericin B), a triazolok (itraconazol, FLU, posaconazol és voriconazol), az echinocandinok (CAS, anidulafungin (ANI), micafungin (MICA)) és az 5-fluorocitozin (Andes 2013).

2.4.1. Echinocandinok

A kereskedelmi forgalomban három, szisztémás terápiában alkalmazott echinocandin kapható. A csoport első, FDA (US Food and Drug Administration) és EMEA (Európai Gyógyszerügynökség) által jóváhagyott tagja a CAS volt 2001-ben (Chen és mtsai. 2011). Évekkel később az ANI-t és a MICA-t is bevezették a klinikumba. Az FDA a CAS-t lázzal járó neutropénia empirikus terápiájában, oesophagealis és invazív candidiasis (beleértve a candidaemia-t), valamint invazív aspergillosis kezelésében engedélyezte. A MICA-t és ANI-t szintén oesophagealis és invazív candidiasis kezelésére hagyták jóvá, valamint a MICA-t alkalmazzák még hematopoetikus őssejttranszplantált betegek profilaxisában is (Chen és mtsai. 2011, Perlin 2015).

Az echinocandinok ciklikus lipopeptid molekulák, melyeket különböző gombafajok termékeiből kémiai módosítással állítottak elő. A CAS a *Glarea lozoyensis* pneumocandin B fermentációs termékéből származik, míg az ANI az *Aspergillus nidulans* echinocandin B₀, a MICA pedig a *Coleophoma impedri* termékének módosított változata (Kofla és Ruhnke 2011). Ezen gyógyszerek különböző oldallánccal rendelkeznek, melyek valószínűleg szerepet játszanak a csoport tagjai között tapasztalható néhány eltérő farmakokinetikai tulajdonságban (1. ábra) (Glöckner 2011).

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



Az echinocandinok non-kompetitív módon gátolják a β -1,3-D-glükán szintáz enzimkomplexet, ezáltal gátolva a β -1,3-D-glükán polimer szintézisét. Az enzimkomplex két alegységből áll: Fks1p és Rho1p. Az Rho1p egy GTP-kötő fehérje, amely a glükán-szintáz enzim aktivitását szabályozza. A katalitikus szerepet betöltő Fks1p, melyet három gén kódol (FKS1, FKS2, FKS3), az UDP-glükózból történő glükánszintézis folyamatában vesz részt (Deresinski és Stevens 2003, Perlin 2014). A sejtfal fő komponensének hiányában ozmotikus instabilitás jön létre, amely végül a sejt halálához vezet (Kofla és Ruhnke 2011).

Az echinocandinok *in vitro* fungicid hatásúak a legtöbb *Candida* fajjal szemben, beleértve az azol rezisztenciával (*C. krusei*, *C. glabrata*) és az AMB rezisztenciával (*C. lusitaniae*) rendelkező fajokat is. *Aspergillus* speciesek ellen fungisztatikus hatást mutatnak, aktívak továbbá *Pneumocystis jirovecii* ellen is. Nem hatékonyak *Zygomycetes*, *Fusarium*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* fajok, illetve a *Scedosporium polificans* ellen, valamint változó aktivitást mutatnak a *Penicillium* fajok esetében (Chen és mtsai. 2011, Kofla és Ruhnke 2011). Az echinocandinok előnye, hogy képesek penetrálni a biofilmekbe is (ellentétben a FLU-lal), ezért a katéter-asszociált *Candida* infekciók kezelésében kiemelt szerepük lehet (Kuhn és mtsai. 2002, Kofla és Ruhnke 2011, Simitsopoulou és mtsai. 2014).

2.4.1.1. A *Candida* fajok érzékenységének meghatározása echinocandinok iránt

A *Candida* fajok echinocandinok iránti MIC értékének meghatározását két referencia mikrodilúciós módszer szerint végezhetjük el. Az egyik az amerikai CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) által kidolgozott eljárás, a másik az európai EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) technikája. A két módszer alapvetően megegyezik, csupán az alkalmazott plate (kerek, illetve lapos aljú), az inokulum denzitása, a táptalaj glükóz tartalma, valamint a MIC leolvasás módszere (vizuális, illetve spektrofotometriás) tér el (CLSI 2008, Arendrup és mtsai. 2010).

2007-ben a CLSI echinocandin klinikai határértékeket vezetett be, ahol az összes ≤ 2 mg/l MIC értéket mutató *Candida* fajt az érzékeny kategóriába sorolták. Ennek megállapításakor echinocandin rezisztenciát még nem detektáltak a *Candida* fajok között, emiatt a CLSI nem határozott meg rezisztens kategóriát, hanem a >2 mg/l MIC értékkel rendelkező törzseket nem érzékenynek tekintette (Pfaller és mtsai. 2011/c).

Pfaller és munkatársai az akkor érvényben lévő echinocandin határértékeket alkalmazva vizsgálták a különböző *Candida* fajok érzékenységét. A *C. albicans* és *C. glabrata* FKS mutáns törzsei magasabb MIC értékeket mutattak mindhárom echinocandin jelenlétében a vad típusú törzsekkel összehasonlítva, azonban ezek nem feltétlenül haladták meg a 2 mg/l-t.

Miközben a CAS esetében a *C. albicans* mutáns törzsek 83%-át és a *C. glabrata* mutáns törzsek 85%-át azonosítani lehetett a >2 mg/l MIC érték alapján, az ANI és MICA esetében ez az arány csak 16%, valamint 50% volt (Pfaller és mtsai. 2011/c). Hasonló eredményeket publikált több kutatócsoport is, melyek alapján javasolták a határértékek csökkentését 0,25 mg/l-re az FKS mutáns izolátumok megfelelő felismerése érdekében (Garcia-Effron és mtsai. 2009/a,b, Wiederhold és mtsai. 2008). Ezeket az adatokat, továbbá a farmakokinetikai/farmakodinámiás paramétereket és a klinikai kimenetelt figyelembe véve a CLSI új fajspecifikus határértékeket hozott létre 2012-ben (1. táblázat) (CLSI 2012). A *C. glabrata* esetében az eredmények tükrében indokolt volt alacsonyabb érzékenységi határértéket bevezetni ($\leq 0,12$ mg/l CAS-t és ANI-t, $\leq 0,06$ mg/l MICA-t tekintve). Az új határértékeknek köszönhetően hatékonyabb lett az FKS mutáns izolátumok detektálása (79-100% a *C. albicans*, valamint 92-100% a *C. glabrata* izolátumoknál) (Pfaller és mtsai. 2011/c).

1. táblázat. A CLSI által bevezetett fajspecifikus echinocandin érzékenységi határértékek *Candida* fajok esetében (Pfaller és mtsai. 2011/c).

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

2.4.1.2. Farmakodinámiás tulajdonságok

Az echinocandinok koncentrációfüggő hatást mutatnak. A klinikai hatékonyság a C_{max}/MIC (a gyógyszer szérumban mérhető maximális koncentrációja/minimális gátló koncentráció) és az AUC/MIC (AUC: area under curve, plazmakoncentráció-idő függvény alatti terület/minimális gátló koncentráció) farmakodinámiás paraméterekkel áll leginkább összefüggésben. Az ilyen típusú szerek esetében a klinikai hatékonyság elméletileg fokozható, ha a napi, alacsony dózisok helyett egyszeri, nagyobb dózisokat adagolunk (Lepak és Andes 2014).

Invazív candidiasis kezelésében az echinocandinokat jelenleg napi egyszeri, alacsony dózisban alkalmazzák. A MICA-t kivéve (napi 100 mg) a terápia első napján telítő dózis

szükséges a célkoncentráció (1 mg/l) eléréséhez, így a kezelési stratégia CAS esetében 70 mg után napi 50 mg fenntartó dózis, ANI esetében pedig 200 mg után 100 mg fenntartó dózis (Pappas és mtsai. 2009). Ez a célkoncentráció, mely a klinikailag jelentős *Candida* izolátumok legalább 90%-át gátolja, az ajánlott dózissal fenntartható a szérumban a kezelés időtartama alatt. Az echinocandinok nagy molekulatömege miatt az orális biohasznosulásuk csekély (CAS esetén <0,2%), ezért csak intravénásan adagolhatók. Optimális szöveti eloszlást mutatnak a tüdőben, májban, vesében, valamint a lépben, ezzel szemben gyengén penetrálnak a szembe és a központi idegrendszerbe (a terápiás szintet nem érik el) (Chen és mtsai. 2011).

A ritkább adagolást segíti elő a koncentrációfüggő hatás mellett az *in vitro* mérhető viszonylag hosszú posztantifungális hatás (PAFE) (Lepak és Andes 2014). Ernst és munkatársai >12 órás CAS által kifejtett PAFE-t figyelték meg a MIC érték feletti koncentrációkon RPMI-1640 tápközegben *C. albicans* esetében (Ernst és mtsai. 2000). Hasonló PAFE figyelhető meg *C. glabrata* és *C. parapsilosis* izolátumok esetén, sőt már az egy órás CAS expozíció is legalább 24 óráig gátolja az izolátumok újránövekedését (Clancy és mtsai. 2006).

A többi antifungális szerrel összevetve az echinocandinok kedvező farmakodinámiás és farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkeznek, valamint kevés az alkalmazásuk során tapasztalható mellékhatás. Betts és munkatársai igazolták, hogy a jelenleg érvényben lévő terápiás ajánlás és a nagyobb CAS dózis (150 mg/nap) hasonlóan biztonságos és jól tolerálható. A 204 invazív candidiasisban szenvedő betegnél legtöbbször előforduló mellékhatás mindkét kezelési csoport esetében a phlebitis (3,8% és 2,0%) és a májenzimek szintjének emelkedése (alkalikus foszfatáz: 6,9% és 2,0%-os emelkedés, illetve aszpartát transzamináz: 4,0% és 2,0%-os emelkedés) volt. Nem tapasztaltak azonban szignifikáns különbséget a két kezelés hatékonyságában, tehát a 150 mg/nap CAS dózis nem eredményezett jobb terápiás kimenetelt (Betts és mtsai. 2009).

2.4.1.3. Caspofungin

Egyszeri, illetve többszöri CAS dózis farmakokinetikáját vizsgálva megállapították, hogy a beadott gyógyszer plazmakoncentrációja polifázikus módon csökken. Közvetlenül az egyszeri dózis beadása után egy rövid (1-2 óra) alfa vagy disztribúciós fázist lehet megfigyelni, melyet egy domináns, 6-48 óráig tartó β -fázis követ. Nagyobb dózisok esetén (40 mg, 70 mg, illetve 100 mg) 2-3 nap múlva is mérhető alacsony koncentráció a szérumban (γ -fázis). Az egyszeri dózis lineáris farmakokinetikát mutatva lassan ürül (clearance 9,85–12,43 ml/perc). Többszöri adagolás során bebizonyították, hogy a hatóanyag kiürülése több lépésben történik és a

szöveti akkumuláció miatt farmakokinetikája nem lineáris. Az akkumuláció dóziszfüggő, melynek mértéke a bejuttatott gyógyszer mennyiséggel együtt növekszik. Az AUC_{0-24} értéket tekintve a 15 mg-os napi dózissal elért 24%-os akkumuláció 50%-ra növekedett a napi 50, valamint 70 mg beadott CAS esetén (Stone és mtsai. 2002).

A szöveti akkumuláció jelentőségét bizonyítja, hogy a CAS terminális féléletideje közel megháromszorozódott (59,2 óra), amikor a szövetekben és a szérumban jelenlévő CAS féléletidejét is figyelembe vették, összehasonlítva a csak a szérumban lévő gyógyszer féléletidejével (20,2 óra). Az adatok szerint a CAS hosszú ideig perzisztál terápiás koncentrációban a szövetekben, ahonnan bizonyos idő után visszaáramlik a vérbe. Ennek a jelenségnek központi szerepe lehet a szer kitűnő *in vivo* aktivitásában (Louie és mtsai. 2005). Farmakodinámiás vizsgálatokkal megállapították, hogy egérmodellben disszeminált candidiasis esetén a CAS hatékonyságát főleg az AUC/MIC arány határozza meg. Mindezek alapján a heti egyszeri nagy dózis vagy két részre osztott dózis ugyanolyan hatékony lehet, mint a jelenleg elfogadott kezelés (Louie és mtsai. 2005, Gumbo 2007).

A CAS elsősorban a májban bomlik le hidrolízissel és N-acetilációval. Inaktív metabolitjai a vizelettel és a széklettel távoznak a szervezetből. Az echinocandinok nem változtatják meg a citokróm P450 enzimrendszer és a P-glikoprotein transzport rendszer működését, ezért kevés a hozzájuk köthető gyógyszer-gyógyszer interakció. A rifampin, nevirapin, efavirenz, carbamazepin, phentoin és a dexametazon kis mértékben növeli a CAS clearance-t. A CAS csökkenti a tacrolimus AUC értékét (20%-kal), valamint a csúskoncentráció és a 12 órás koncentráció értékét is, ezért e két szer együttes adagolásánál szükséges a vér tacrolimus koncentrációjának folyamatos monitorozása (Denning 2003, Kofla és Ruhnke 2011, Chen és mtsai. 2011).

2.4.1.4. Paradox növekedés

In vitro kísérletekben gyakran előforduló jelenség, hogy nagyobb koncentrációjú echinocandin jelenlétében a gyógyszer aktivitása csökken az adott kórokozóval szemben. A folyamatot paradox növekedésnek (PG) nevezzük, mely az antibakteriális szereknél tapasztalható Eagle-effektushoz hasonló. Négy jól elkülöníthető szakaszból áll, ahol MIC érték alatti növekedés, majd MIC érték feletti gátlás után a magasabb koncentrációkon újra növekedés látható. Végül a legmagasabb koncentrációkon teljes növekedésgátlás tapasztalható (Vanstraelen és mtsai. 2013).

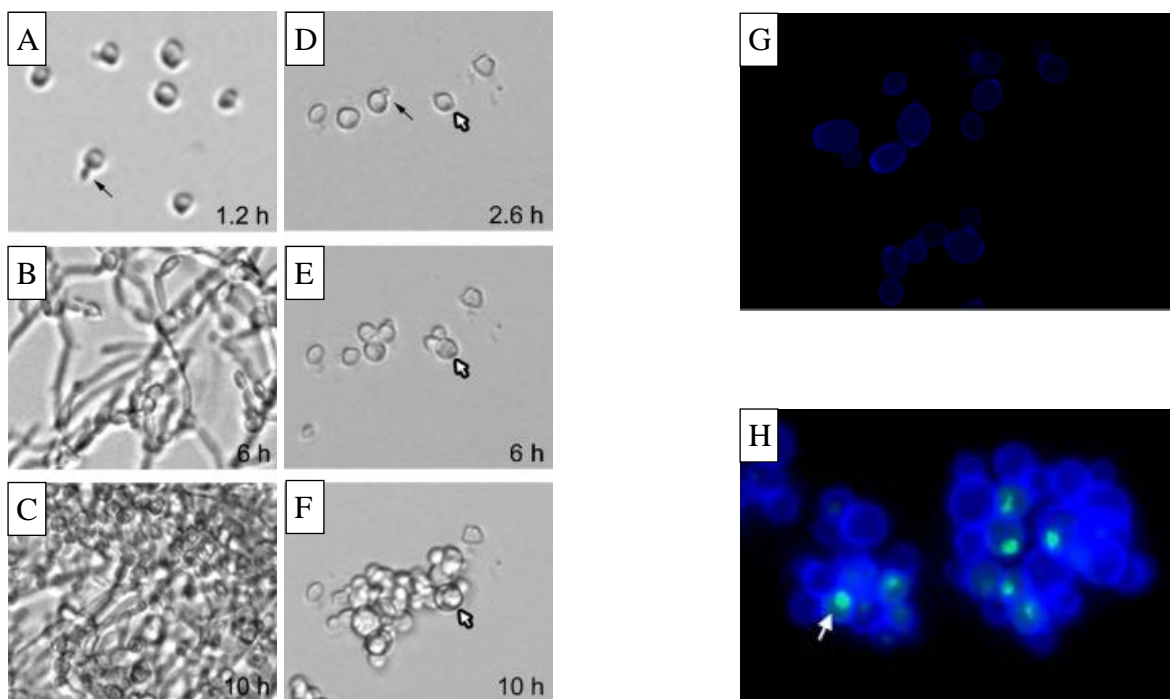
A PG kizárólag az echinocandinokra jellemző, azonban az előfordulása függ az adott *Candida* fajtól, izolátumtól, a tesztközegetől, valamint az alkalmazott echinocandintól.

Mikrodilúciós érzékenység meghatározás során PG-t figyeltek meg *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* és *C. dubliniensis* izolátumoknál, azonban annak hiányát fedezték fel *C. glabrata* esetében (Chamilos és mtsai. 2007, Vanstraelen és mtsai. 2013). Fontos megemlíteni, hogy idő-ölés kísérletekben olyan *C. albicans*, *C. glabrata* és *C. parapsilosis* izolátumok is mutattak PG-t, melyek előzőleg a standard mikrodilúciós módszerrel nem. Ezeket figyelembe véve az idő-ölés kísérletek alkalmasabbak lehetnek a PG detektálására (Shields és mtsai. 2011). PG leggyakrabban a CAS esetén tapasztalható (*C. albicans* 60%, *C. parapsilosis* 90%, *C. tropicalis* 40%, *C. krusei* 10%), a MICA (*C. tropicalis* 70%, *C. krusei* 60%) és az ANI (*C. albicans* 40%, *C. tropicalis* 20%) használata során kevésbé fordul elő. Érdekesség, hogy csak a *C. tropicalis* mutatott mindhárom echinocandin esetében PG-t (Chamilos és mtsai. 2007).

PG közben a sejt morfológiai és biokémiai változásokon megy keresztül. A magas gyógyszerkoncentráció olyan stresszválaszt indukál, mely a *Candida* fajoknál kompenzatórikus kitinszintézist eredményez. A folyamat során a protein kináz C (PKC), a calcineurin, valamint a HOG (high-osmolarity glycerol response) útvonalak aktiválása miatt a kitinszintézis fokozódik, ezzel egyidejűleg pedig lecsökken a sejt falban az 1,3- β -D-glükán tartalom. A változás jelentős, ugyanis az 1,3- β -D-glükán tartalomban 2,7-7,8-szoros csökkenést, a kitintartalomban pedig 4-6,6-szoros növekedést figyeltek meg (Bizerra és mtsai. 2011, Vanstraelen és mtsai. 2013). A PG-t mutató sejtek jellemzője az abnormálisan nagy sejt méret, a sejtek csoportosulása és a filamentáció hiánya (2. ábra) (Bizerra és mtsai. 2011, Rueda és mtsai. 2014).

C. albicans esetében 10% humán szérum hozzáadása az RPMI-1640 tesztközeghez nem befolyásolta, de 50% humán szérum hozzáadása már megszüntette a PG-t. Mivel a vérnek körülbelül 50%-a szérum (a többi az alakos elem), a szerzők arra következtettek, hogy a PG klinikai relevanciája valószínűleg csekély (Shields és mtsai. 2011).

2. ábra. Paradox növekedés közben történő celluláris változások. Kezeletlen sejtek (kontroll) (A-C) és 8 mg/l caspofunginnal kezelt sejtek (D-F) time-lapse felvétele, valamint kitinspecifikus festékkel (calcofluor white) megfestett sejtek (G: kontroll, H: 8 mg/l caspofunginnal kezelt) fluoreszcens mikroszkópos képe (Rueda és mtsai. 2014)



2.4.1.5. Antifungális szerekkel szembeni rezisztencia

A leggyakrabban alkalmazott azol típusú antifungális szer a FLU, amelyet széleskörűen használnak candidiasis ellen mind terápiásan, mind pedig profilaktikusan. *C. glabrata* infekciók kezelésére nem elsőként választandó szer, mivel az izolátumok között gyakori a csökkent érzékenység azolokkal szemben. Ilyen fertőzések esetén az empirikus, valamint a célzott terápiás ajánlás az echinocandinok alkalmazása (Pappas és mtsai. 2009, Pfaller és mtsai. 2012). Alexander és munkatársai tíz éves periódus alatt vérmintákból gyűjtött *C. glabrata* izolátumok érzékenységét vizsgálták. A hemokultúra pozitívítás után elkezdett antifungális terápia mellett az esetek 30%-ában alakult ki ún. áttöréses fertőzés („breakthrough” candidaemia), melyeknél túlnyomóan azolokat alkalmaztak (69,6%) (Alexander és mtsai. 2013). Egy másik, USA-ban készült tanulmányban a vizsgált *C. glabrata* izolátumok 100%-ánál tapasztaltak csökkent FLU aktivitást (Wisplinghoff és mtsai. 2014). A megfelelő kezelési stratégia megválasztását tovább nehezíti, hogy a FLU rezisztens *C. glabrata* izolátumok körében egyre többször jelenik meg echinocandin rezisztencia is (Alexander és mtsai. 2013). Ezzel ellentétben a *C. albicans* esetében a FLU rezisztencia ritka (Huyke és mtsai. 2015, Wisplinghoff és mtsai. 2014).

A rezisztens fajok megjelenését az echinocandinok széleskörű alkalmazása is elősegíti, ugyanis egy nemrég készült felmérés szerint a candidaemia-ban szenvedő betegek >60%-a echinocandin kezelésben részesül (Cleveland és mtsai. 2012). Echinocandinokkal szembeni rezisztenciát legelőször 2005-ben jelentettek, jelenleg is viszonylag ritkán tapasztalható a *C. albicans* és a legtöbb *Candida* faj esetében (<3%). Kivételt képez ez alól a *C. glabrata*, melynél 8-9,3%-os echinocandin rezisztenciáról számoltak be 2006-2010-ben (Perlin 2015). A rezisztencia növekedésének mértékét szemlélteti továbbá, hogy egy tíz éves periódust vizsgáló tanulmányban az echinocandin rezisztencia 2-3%-ról >13%-ra emelkedett a hemokultúrából származó *C. glabrata* izolátumok között (Perlin 2014).

A csökkent echinocandin érzékenység vagy rezisztencia oka az FKS1 génben bekövetkező pontmutáció, amely aminosav szubsztitúcióhoz vezethet az Fks1p alegység két úgynevezett „hot-spot” (HS) régiójában. Pontmutációk egyaránt kimutathatók a *C. albicans* és a non-*albicans Candida* fajokban (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*). A *C. glabrata* esetében az echinocandin rezisztencia összefüggésben van az FKS2 gén mutációjával is (2. táblázat). Az FKS gén változása a legtöbb esetben keresztrezisztenciát idéz elő mindhárom echinocandin iránt (Arendrup és Perlin 2014). Rezisztencia leginkább hosszantartó echinocandin terápia során alakulhat ki, ugyanakkor rövid időn belül a kezelés kezdete után (akár 8 nap alatt) is megjelenhet (Perlin 2014, Lackner és mtsai. 2014, Lewis és mtsai. 2013).

Ez a rezisztencia mechanizmus MIC érték emelkedést, valamint gyakran terápiás sikertelenséget eredményez. Fontos kiemelni azonban, hogy a MIC érték emelkedésének mértéke, az adott *Candida* faj fitnessze, illetve a terápia kimenetele függ a mutáció helyétől és az aminosav szubsztitúciótól (Lackner és mtsai. 2014, Perlin 2014). A *C. albicans* esetében ezek a mutációk a HS1 régió 641-649 aminosav pozícióiban és a HS2 régió 1345-1365 pozícióiban alakulnak ki (Beyda és mtsai. 2012). Az aminosav csere döntően a Ser645 és a Phe641 pozíciókban fordul elő (a rezisztens *C. albicans* izolátumok közel 80%-a), mely a leggyakrabban azonosítható rezisztens fenotípust okozza. Hasonlóan jelentős szubsztitúció a *C. glabrata* esetében a Ser629 (FKS1), a Ser663 és Phe659 (FKS2) pozíciókban történik. A kevésbé prominens FKS mutációk is rezisztenciát váltanak ki echinocandinok iránt, azonban az általuk okozott szisztémás fertőzések állatmodellekben dózisznöveléssel sikeresen kezelhetők (Perlin 2015).

A mutációnak köszönhetően megváltoznak a glükán-szintáz enzimkinetikai tulajdonságai. A vad típusú enzimhez képest a mutáns enzim IC₅₀ (félhatásos gátló koncentráció) értéke megemelkedik, valamint a V_{max} (katalitikus sebesség) értéke szignifikánsan csökken. Utóbbinak a következménye lehet a sejt fitnessz csökkenése. Garcia-Effron és munkatársai 14

mutáns enzimet vizsgálva megállapították, hogy a Ser645 helyen történő mutáció eredményezte a legnagyobb MIC érték (8->100-szoros), illetve IC₅₀ érték emelkedést (Garcia-Effron és mtsai. 2009).

Az echinocandin rezisztencia terjedését korlátozza az FKS1 mutáció virulenciára, valamint fitnessre kifejtett hatása. Mivel ezzel a szerzett rezisztenciával többnyire csökkent virulencia és fitness jár együtt, így a mutáns *Candida* törzsek evolúciós hátrányba kerülnek a vad típusú törzsekhez képest (Arendrup és Perlin 2014). Ben-Ami és munkatársai tanulmánya szerint 5 homozigóta FKS1 mutáns mutatott csökkent virulenciát Toll-deficiens *Drosophila melanogaster* modellben. Emellett két mutánsnál tapasztaltak szignifikánsan magasabb túlélési arányt és alacsonyabb szöveti csíraszámot disszeminált candidiasis esetén rágcsáló modellben, összehasonlítva a vad típusú törzssel (Ben-Ami és mtsai. 2011).

Néhány *Candida* faj természetes polimorfizmussal rendelkezik az FKS1 génben, ezért intrinszik csökkent érzékenységet mutatnak echinocandinok iránt. A „*psilosis*” csoport tagjainál (*C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*) az Fks1p fehérje HS1 régiójának 660. pozíciójában prolin→alanin aminosav csere van jelen, míg a *C. guilliermondii* esetében a 633. (leucin→metionin) és a 634. helyen (tirozin→alanin) található változás (2. táblázat) (Garcia-Effron és mtsai. 2008, Perlin 2015). Felmérések alapján az előbb említett fajok általában magasabb MIC értékkel rendelkeznek (0,5-8 mg/l), mint az érzékeny *Candida* fajok (Beyda és mtsai. 2012, Pfaller és mtsai. 2011/c).

2. táblázat. Az FKS gének által kódolt fehérjékben bekövetkező aminosav változások, valamint azok hatása a *Candida* fajok echinocandin érzékenységre (Arendrup és Perlin 2014). A számok a hot spot régiók első aminosavának a pozícióját jelölik.

Faj	Fks1p		Fks2p	
	Hot spot 1	Hot spot 2	Hot spot 1	Hot spot 2
	szekvencia	szekvencia	szekvencia	szekvencia
<i>C. albicans</i>	641 FLTL S LRDP	1357 DWIR R YTL	-	-
<i>C. dubliniensis</i>	641 FLTL S LRDP	1357 DWIR R YTL	-	-
<i>C. glabrata</i>	625 FL I LSLRDP	1340 DW V RRYTL	659 FL I LSLRDP	1374 DW I RRYTL
<i>C. kefyr</i>	54 FLTL S LRDP	769 DW V RRYTL	-	-
<i>C. krusei</i>	655 FL I LSIRD P	1364 DWIR R YTL	-	-
<i>C. lusitaniae</i>	634 FLTL S LRDP	DWIR R YTL	-	-
<i>C. tropicalis</i>	76 FLTL S LRDP	792 DWIR R YTL	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	652 FLTL S LRD A	1369 DWIR R YTL	-	-
<i>C. metapsilosis</i>	104 FLTL S LRD A	821 DWIR R YTL	-	-
<i>C. orthopsilosis</i>	39 FLTL S LRD A	756 DW V RRYTL	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	632 F M ALSLRDP	1347 DWIR R YTL	-	-
<i>C. lipolytica</i>	662 FL I LSLRDP	1387 DWIR R CVL	-	-

X erős rezisztencia, **x** gyenge rezisztencia, **X** természetesen előforduló mutáció, **x** „silent” mutáció

2.4.1.6. A humán szérum hatása az echinocandinok farmakodinámiájára

Az echinocandinok nagymértékben kötődnek szérumfehérjékhez, elsősorban az albuminhoz (MICA 99,8%-ban, ANI 99%-ban, CAS 96,5%-ban), mely befolyásolja a szerek farmakodinámiás tulajdonságait. A kötődés eredményeképpen az echinocandinok antifungális hatása csökken, melyet *in vitro* és *in vivo* kísérletek is alátámasztanak (Odabasi és mtsai. 2007, Garcia-Effron és mtsai. 2011, Nasar és mtsai. 2013).

A „szabad gyógyszer hipotézis” szerint, csak a nem kötött gyógyszerfrakciónak van farmakológiai hatása. A hipotézist alapul véve a beadott MICA dózisnak csupán 0,2%-a, a CAS-nak 3,5%-a lenne farmakológiailag aktív, ezzel együtt az *in vitro* mért MIC értékek 200-500-szorosára növekednének. Ennek ellenére a MIC érték növekedés nem ilyen nagymértékű (Paderu és mtsai. 2007, Odabasi és mtsai. 2007, Garcia-Effron és mtsai. 2011). Ishikawa és munkatársai a MICA esetében csak 4-267-szeres arányról számoltak be, vagyis farmakodinámiája nem követi a szabad gyógyszer hipotézist. A lehetséges magyarázatok között szerepel a relatíve gyenge és reverzibilis fehérjekötődés (Ishikawa és mtsai. 2009).

Paderu és munkatársai a CAS esetében 1-16-szoros, a MICA-nál 32-128-szoros, míg ANI-nál 8-256-szoros emelkedést tapasztaltak, mikor 50% humán szérumot alkalmaztak a mikrodilúciós érzékenység meghatározás során *Candida* izolátumok ellen (Paderu és mtsai. 2007). Hasonló adatokat közölt Odabasi és munkatársai is, emellett megállapították, hogy az echinocandinok fehérjekötődésének mértéke nem áll összefüggésben a MIC érték növekedésével (Odabasi és mtsai. 2007). A nemzetközi eredmények alapján tehát 50% humán szérum számottevően csökkentette az ANI és a MICA aktivitását, de CAS esetében kisebb mértékű MIC érték növekedés következett be.

Cota és munkatársai *C. glabrata* klinikai izolátumokat vizsgálva megfigyelték, hogy az ANI jobb *in vitro* aktivitás mutatott (alacsonyabb MIC, IC₅₀ és IC₉₀ értékek), mint a CAS. Kísérleteikben nem alkalmaztak szérumot (Cota és mtsai. 2006). Ezzel szemben ez a fokozott aktivitás nem volt tapasztalható immunszuppresszált egérmodellben, mivel az ANI kezelés nem eredményezett nagyobb mértékű szöveti csíraszám csökkenést, sőt a 0,5 mg/kg, valamint az 1 mg/kg napi dózisok esetén a CAS szignifikánsan hatékonyabb volt ($p < 0,001$), mint az ANI (Wiederhold és mtsai. 2007).

A fentebb említett eredményeket figyelembe véve célszerű az *in vitro* kísérletekben szérumot alkalmazni, mellyel jobban demonstrálhatjuk a szervezetben lezajló folyamatokat. A szérum alapú érzékenységi módszerek tehát megbízhatóbb alapot nyújthatnak az echinocandinok klinikai hatékonyságának a pontosabb megállapításához. Ezenkívül

segíthetnek az echinocandin rezisztens *Candida* izolátumok felismerésében is (Garcia-Effron és mtsai. 2011). A rutin diagnosztikában azonban a standardizálási nehézségek miatt nem használnak szérumot a *Candida* fajok echinocandin érzékenységének meghatározásához. További problémát jelent, hogy a *C. glabrata* rosszul vagy egyáltalán nem növekedik szérum jelenlétében (Nasar és mtsai. 2013).

3. Célkitűzés

Kísérleteink során a caspofungin dózisznövelés hatékonyságát vizsgáltuk a két, Magyarországon leggyakrabban izolálható *Candida* faj esetében.

Munkánkban célunk volt:

- A caspofungin minimális gátló koncentrációjának meghatározása standard mikrodilúciós módszer segítségével *C. albicans* és *C. glabrata* izolátumokkal szemben, továbbá a *C. albicans* izolátumok esetében az értékek összehasonlítása az E-teszt során kapott eredményekkel
- A caspofungin *in vitro* hatékonyságának vizsgálata *C. albicans* és *C. glabrata* izolátumok ellen normál RPMI-1640-ben, valamint 50% humán szérummal kiegészített tápközegben idő-ölés kísérletek segítségével
- Az idő-ölés kísérletek adatait felhasználva a caspofungin ölési rátájának meghatározása *C. albicans* és *C. glabrata* izolátumok ellen
- A caspofungin *in vivo* hatékonyságának vizsgálata napi 1, 2, 3, 5 és 15 mg/kg dózisokat alkalmazva *C. albicans*-szal, valamint napi 1, 2, 3, 5 és 20 mg/kg dózisokat alkalmazva *C. glabrata*-val fertőzött neutropéniás egérmodellben

4. Anyagok és módszerek

4.1. A vizsgált izolátumok

Kísérleteink során 6 *C. albicans* (14171, 18799, 35035, 5265, 10781, 34350), 4 *C. glabrata* (11900, 9098, 18910, 15242) klinikai izolátumot, 4 ATCC (American Type Culture Collection) teszt törzset (10231, 90030, 6258, 22019) és 2-2 echinocandin rezisztens *C. albicans* (DPL18, DPL20), illetve *C. glabrata* (DPL27, DPL245) izolátumot vizsgáltunk. Az összes vizsgált klinikai izolátum vérből származott, melyek izolálása még az antifungális terápia megkezdése előtt megtörtént. A *C. albicans* és *C. glabrata* izolátumok azonosítását a Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetében API ID32C panel és MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight) tömegspektrométer segítségével végeztük el. Az echinocandin rezisztenciával rendelkező DPL18 (F641S mutáció), DPL20 (F645P mutáció), DPL27 (S663P mutáció) és DPL245 (S629P mutáció) törzseket David S. Perlin (Public Health Research Institute, New Jersey Medical School-Rutgers, Newark, New Jersey, USA) biztosította.

4.2. *In vitro* érzékenységi vizsgálatok

A CAS MIC értékek meghatározása kétféle tápközegben, RPMI-1640-ben, valamint 50% humán szérummal (AB vércsoportú férfi, Sigma, Budapest, Magyarország) kiegészített RPMI-1640-ben történt a CLSI által elfogadott M27-A3-as dokumentum alapján standard mikrodilúciós módszerrel (CLSI 2008). A MIC meghatározást 0,015-32 mg/l koncentráció határok között végeztük el 96 üregű ELISA-lemezekben. Referenciaként az ATCC 6258 *C. krusei* és az ATCC 22019 *C. parapsilosis* törzseket alkalmaztuk. Az egyes törzsek 0,5 McFarland sűrűségű gombaszuszpenzióinak elkészítéséhez 24 órás Sabouraud agaron nőtt tenyészeteket használtunk. Az üregekben 10^3 CFU (Colony Forming Unit)/ml kezdő csíraszámot állítottunk be RPMI-1640 táptalajban. A különböző CAS koncentrációk mellett a lemezekben gombakontroll (antifungális szert nem tartalmazó) és táptalajkontroll (sarjadzó gombát nem tartalmazó) üregeket is alkalmaztunk. Az izolátumok MIC értékét 24 órás 35°C-os inkubálást követően vizuálisan olvastuk le. MIC értéknek tekintettük azt a legkisebb CAS koncentrációt, ahol legalább 50%-os növekedés csökkenés volt megfigyelhető a gyógyszermentes kontrollhoz képest (CLSI 2008).

A *C. albicans* izolátumok esetében a CAS MIC értékeket E-teszt (AB Biodisk, Svédország) segítségével is meghatároztuk. Az E-teszthez 2% glükózzal kiegészített RPMI-

1640 táptalajt alkalmaztunk 50% szérummal, illetve 50% szérum nélkül. Az izolátumok 24 órás tenyészetéből készített 0,5 McFarland sűrűségű gombaszuszpenziókat steril tampon segítségével egyenletesen kiszélesztettük az agarok felszínére. A táptalajok száradását követően ráhelyeztük a CAS-nal átitatott tesztesíkokat, majd 35°C-on történő 24 órás inkubálás után a MIC értékeket szintén vizuálisan olvastuk le. A MIC érték az a koncentráció, ahol az ellipszis alakú gátlási zóna metszi a tesztesíkot (CLSI 2008). A MIC értékek meghatározását Dr. Kovács Renátó és Bozó Aliz segítségével végeztem el.

4.2.1. Idő-ölés (time-kill) görbék felvétele az antifungális hatás vizsgálatához

Az idő-ölés kísérletekben Klepser és munkatársai által megadott módszer szerint határoztuk meg a CAS *in vitro* hatékonyságát (Klepser és mtsai. 1998). A normál RPMI-1640, valamint 50% humán szérummal kiegészített tápközegben elvégzett kísérletek során 0,25-32 mg/l CAS koncentrációkat vizsgáltunk, koncentrációnként 10 ml-es végtérfogatban (1. kép). Az echinocandin rezisztens izolátumok esetében a magas MIC értékek miatt csak a 8, 16 és 32 mg/l koncentrációkkal dolgoztunk. A legmagasabb vizsgált koncentrációnak a 32 mg/l CAS-t választottuk, mert klinikai adatok alapján a napi 150-200 mg CAS adagolása esetén is csupán 30,4-40,6 mg/l-es szérumban mérhető csúcskoncentráció érhető el (Cornely és mtsai. 2011).

Az izolátumokból denzitométer segítségével $\sim 10^5$ CFU/ml kiindulási inokulumot állítottunk be a kísérletekhez. A különböző gyógyszerkoncentrációkat tartalmazó csövekből 0, 4, 8, 12, 24 és 48 óránként kivett 100-100 μ l mintákból tízes alapú tovafutó hígítási sorozatot készítettünk, majd ezekből a hígításokból 4x30 μ l-t oltottunk Sabouraud-dextróz agarra (2. kép, 3. kép). A táptalajokat 48 óráig 35°C-on inkubáltuk. Az inkubációs idő után a kinőtt telepeket megszámláltuk (4. kép) és a hígítási fokok ismeretében megállapítottuk az élő gombasejtek számát, melyeket az idő függvényében ábrázoltunk. Az idő-ölés görbéket GraphPad Prism 4.03 Windows szoftver segítségével készítettük el (Kovács és mtsai. 2014). Az idő-ölés kísérletek elvégzésében RPMI-1640 és 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640 tápközegben az értekezésem alapjául szolgáló közlemények társszerzői nyújtottak segítséget.

4.2.2. Az *in vitro* adatok kiértékelése

Azt a CAS koncentrációt tekintettük fungicidnek, amelynél a kezdő csíraszámhoz képest legalább 99,9%-os sejtszám csökkenést figyeltünk meg. Ennél kisebb mértékű csíraszám csökkenés esetében a szer fungisztikus hatása.

Az idő-ölés kísérletek során kapott adatokat használtuk fel, hogy meghatározzuk a CAS ölési kinetikáját mindkét alkalmazott tesztközegben. Az ölési kinetikát az alábbi exponenciális egyenlet segítségével számítottuk ki: $N_t = N_0 \times e^{-kt}$, ahol a N_t az élő sejtek száma adott időpontban, az N_0 a kísérlet kezdetén mért élő sejtszám, a k az ölési ráta, a t pedig az inkubációs idő. A pozitív k érték a gombasejtek ölését, a negatív k érték azok növekedését jelenti. Az illesztés jóságát r^2 használatával ellenőriztük ($r^2 > \pm 0,8$). Mindegyik izolátum, illetve koncentráció esetében a 99,9%-os sejtszámcsökkenéshez szükséges időt (t) a k értékekből számoltuk ki mindkét tápközegben ($T_{99,9} = 3/k$). A különböző izolátumok és koncentrációk közötti szignifikáns különbségek meghatározását Tukey-féle teszttel kiegészített egyszempontos varianciaanalízissel (one-way ANOVA) végeztük el mindkét tápközegben. Ugyanazon CAS koncentrációk különböző tápközegben mért ölési kinetikáját t -próbával hasonlítottuk össze. A statisztikai analízist Dr. Gesztelyi Rudolf, valamint Dr. Kovács Renátó végezte el. Az eredmények kiértékelése Dr. Kardos Gábor és Dr. Majoros László közreműködésével történt. Szignifikánsnak tekintettük az eredményeket, ha $p < 0,05$ (Cantón és mtsai. 2009, Kovács és mtsai. 2014).

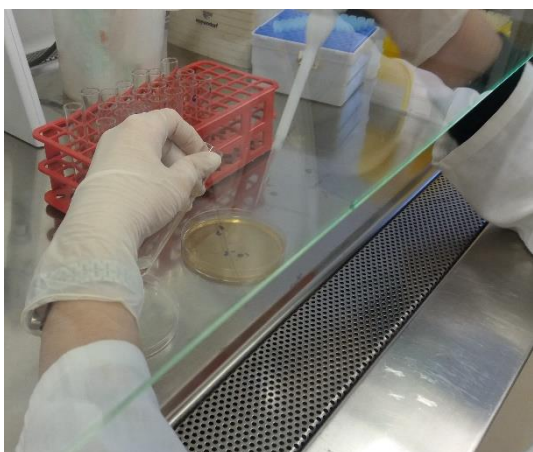
1. kép: Különböző caspofungin koncentrációkat tartalmazó tápközegek



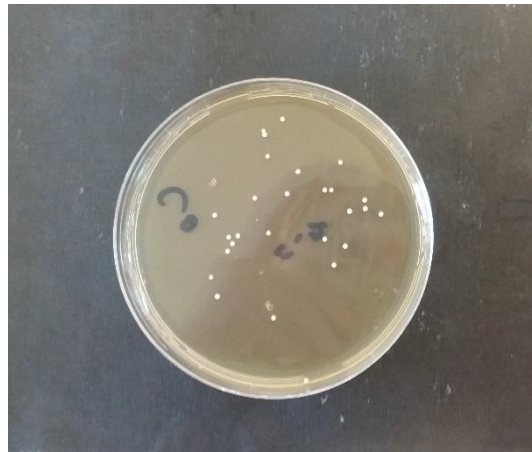
2. kép: Mintavétel után hígítási sorozat készítése



3. kép: Kioltás Sabouraud agarra



4. kép: Inkubáció után kinőtt gombatelepek



4.3. *In vivo* kísérletek

4.3.1. A kísérletben felhasznált egerek

Kísérleteinkhez 20-23 g tömegű BALB/c típusú nőstény egereket használtunk fel (Charles River Laboratories), melyeket a „Laboratóriumi Állatok Alkalmazása és Gondozása” című irányelv szerint tartottunk. Csoportonként 7-8 db egérrel dolgoztunk. Az *in vivo* kísérletek engedélyszáma: 12/2014 DE MÁB.

Az egerekben a tartós neutropeniás állapot létrehozásához intraperitoneálisan cyclophosphamidot (Endoxan) adagoltunk a következő oltási stratégia szerint: a fertőzést megelőző negyedik nap 150 mg/kg, a fertőzés előtti első nap 100 mg/kg, a fertőzést követő második és ötödik nap 100 mg/kg (5. kép) (Berényi és mtsai. 2014, Kovács és mtsai. 2014).

4.3.2. Oltóanyag készítés és a fertőzés menete

Az oltóanyag készítéséhez a vizsgált izolátumokat két egymást követő napon Sabouraud agarra kioltottuk, majd a felfrissített törzseket 3-4 Sabouraud táptalaj felületére szélesztettük. 24 órás 35°C-on történő inkubálás után a kinőtt izolátumokat a táptalajok felszínéről steril vattatamponnal eltávolítottuk és steril fiziológiás sóoldatba szuszpendáltuk. Ezt követően a szuszpenziókat négyszer 10 percig centrifugáltuk 3000 g fordulaton. Mindegyik centrifugálás után a leülepedett gombasejtekről eltávolítottuk a felülúszót, majd 20-25 ml steril fiziológiás sóoldatot pipettáztunk rá. Az utolsó centrifugálási folyamat után körülbelül 8 ml fiziológiás sóoldatot adtunk a gombasejtekhez. Ezután a szuszpenzióból két lépésben 1:10 arányú hígítást végeztünk a Bürker-kamrában történő sejtszámoláshoz. A csíraszámbeállítás ellenőrzése kvantitatív kioltással valósult meg (Berényi és mtsai. 2014, Kovács és mtsai. 2014).

Az egereket 0,2 ml gombaszuszpenzióval a laterális farokvénán keresztül fertőztük meg. A *C. albicans* izolátumok esetében a fertőző csíraszám $7,5 \times 10^4$ CFU/egér, a *C. glabrata* izolátumoknál $6,6-8,4 \times 10^7$ CFU/egér volt. A *C. glabrata* echinocandin rezisztens törzsei esetében ez a fertőző inokulum 5 napon belül 100% mortalitást eredményezett, így alacsonyabb dózissal ($2,5 \times 10^7$ CFU/egér) végeztük a kísérleteket.

4.3.3. Antifungális terápia

Az egerek kezelését a különböző, intraperitoneálisan beadott CAS (Cancidas) dózissal a fertőzés után 24 órával kezdtük el (5. kép). Az öt napig tartó terápia során a *C. albicans* izolátumok esetében 1, 2, 3, 5, 15 mg/kg/nap dózissal, míg a *C. glabrata* izolátumok esetében 1, 2, 3, 5, 20 mg/kg/nap dózissal alkalmaztunk. A kezelési sémákat farmakokinetikai vizsgálatok, valamint saját és más kutatócsoportok korábbi eredményei alapján határoztuk meg (Andes és mtsai. 2010, Kovács és mtsai. 2014, Berényi és mtsai. 2014). A beadott gyógyszer mennyiség egerenként 0,5 ml volt. A *C. glabrata* izolátumoknál a CAS kezelés előtt (Kontroll 1) is meghatároztuk 4-4 egérrel a vesékből kitenyészett élő gombasejtek számát.

A kvantitatív csíraszám meghatározása céljából az egereket a fertőzést követő hatodik napon cervikális diszlokációval elpusztítottuk, majd felboncoltuk (6. kép). A veséket eltávolítottuk, amelyeket a lemérésük után steril dörzscsészében homogenizáltuk. Ezt követően a homogenizátumhoz 1 ml steril fiziológiás sóoldatot adtunk, majd az egyes mintákból 1:10-es alapú hígítási sorozatot készítettünk (7. kép, 8. kép). A megfelelő hígításokból 100 µl mennyiségű mintát oltottunk Sabouraud agarra, majd a táptalajok 48 órás 35°C-on történő inkubálása után a kinőtt telepeket megszámláltuk (9. kép). A kimutatás alsó határa 50 CFU/szövet (g) (Berényi és mtsai. 2014, Kovács és mtsai. 2014). A táptalajon kitenyészett gombák esetén a szignifikancia vizsgálatához Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk (GraphPad Prism 4.03, Windows). Az eredményt szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$ volt (Berényi és mtsai. 2014, Kovács és mtsai. 2014). Az *in vivo* kísérletekben Dr. Juhász Béla, Dr. Kovács Renátó és Bozó Aliz nyújtottak segítséget. A statisztikai analízist Dr. Gesztelyi Rudolf végezte el. Az eredmények kiértékelése Dr. Kardos Gábor, David Perlin és Dr. Majoros László közreműködésével történt.

5. kép: Intraperitoneális oltás



6. kép: Vesék eltávolítása



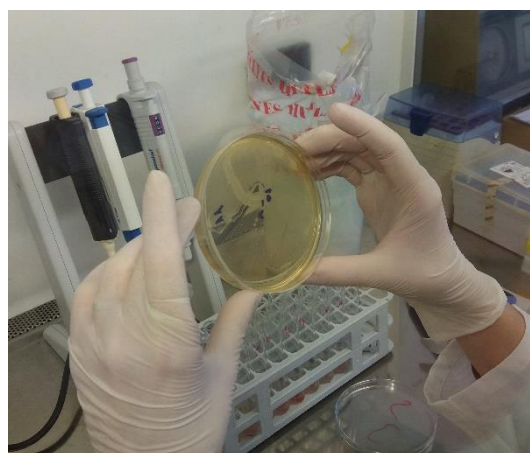
7. kép: Vesék homogenizálása



8. kép: Hígítási sor készítése



9. kép: Kioltás szilárd táptalajra



5. Eredmények

5.1. A caspofungin iránti érzékenység meghatározása mikrodilúciós módszer, valamint E-teszt segítségével

Mikrodilúciós módszerrel normál RPMI-1640 tápközegben az összes vizsgált *C. albicans*, *C. glabrata* klinikai izolátum, valamint a tesztörzsek is érzékenyek voltak CAS iránt a CLSI fajspecifikus határértékei alapján (1. táblázat). A 10781 és 34350 izolátumok esetében PG-t figyeltünk meg (3. táblázat).

A *C. albicans* izolátumok esetében az E-teszt során kapott MIC értékek RPMI-1640-ben ≥ 8 -szor magasabbak voltak, mint a mikrodilúcióval meghatározott MIC értékek. PG-t egyik izolátumnál sem tapasztaltunk (3. táblázat, 3. ábra). A *C. albicans* és *C. parapsilosis* referencia törzsek érzékenyek, míg a *C. krusei* tesztörzs mérsékelten érzékeny volt CAS-ra. A két echinocandin rezisztens izolátum MIC értéke 2, illetve >32 mg/l voltak (3. táblázat).

A *C. albicans* izolátumok MIC értékei 2-16-szoros emelkedést mutattak 50% humán szérummal kiegészített tápközegben mindkét módszer esetén. Habár kevés vad típusú izolátumot vizsgáltunk a teszt során, látható, hogy a MIC értékek szűkebb tartományban helyezkedtek el, összehasonlítva a normál (RPMI-1640) tápközegben megfigyelhető MIC eloszlással (3. táblázat). A *C. glabrata* izolátumok esetében szintén MIC érték emelkedést tapasztaltunk 50% szérumban (4-8-szoros). PG-t nem tapasztaltunk.

A DPL18, DPL20, DPL27 és DPL245 izolátumok CAS rezisztensnek bizonyultak függetlenül az alkalmazott tápközegtől (3. táblázat).

3. táblázat. Mikrodilúciós módszer és E-teszt segítségével meghatározott caspofungin MIC értékek a vizsgált *Candida* fajok esetében RPMI-1640-ben és 50% humán szérummal kiegészített tápközegben.

Izolátum	Mikrodilúcióval meghatározott MIC (mg/l)		E-teszttel meghatározott MIC (mg/l)	
	RPMI-1640	RPMI-1640 + 50% szérum	RPMI-1640	RPMI-1640 + 50% szérum
<i>Candida albicans</i>				
ATCC 10231	0,03	0,5	0,125	0,5
14171	0,03	0,12	0,125	0,25
18799	0,06	0,12	0,125	0,5
35035	0,03	0,25	0,125	0,5
5265	0,015	0,25	0,03	0,5
10781	0,03 ^{PG}	0,12	0,12	0,25
34350	0,015 ^{PG}	0,25	0,12	0,25
DPL20*	4	>32	>32	>32
DPL18**	2	16	2	32
Referencia törzsek				
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0,25	2	0,5	8
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0,5	1	1	2
<i>Candida glabrata</i>				
ATCC 90030	≤0,03	0,125		
11900	≤0,03	0,25		
9098	≤0,03	0,125		
18910	≤0,03	0,125		
15242	≤0,03	0,25		
DPL27***	8	8		
DPL245****	>32	>32		

*echinocandin rezisztens *Candida albicans* (FKS F645P)

**echinocandin rezisztens *Candida albicans* (FKS F641S)

***echinocandin rezisztens *Candida glabrata* (FKS S663P)

****echinocandin rezisztens *Candida glabrata* (FKS S629P)

PG paradox növekedés

3. ábra. E-teszt módszerrel meghatározott caspofungin MIC értékek a *C. albicans* 10781-es izolátum esetében. A tesztcsíkon a számok megfelelnek a különböző koncentrációknak (mg/l). Bal oldalon az RPMI-1640-ben (0,125 mg/l), jobb oldalon a szérumos közegben (0,25 mg/l) kapott érték látható.



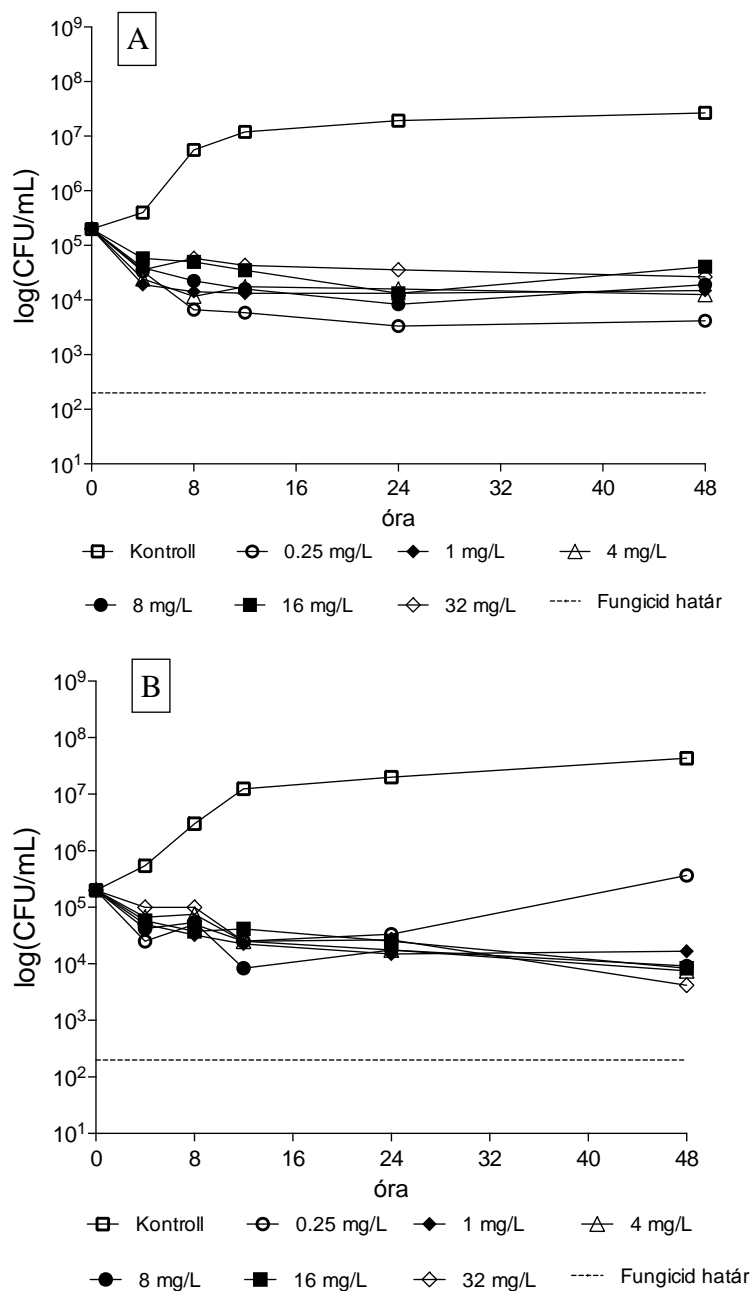
5.2. Az idő-ölés kísérletek eredményei RPMI-1640 és RPMI-1640+50% humán szérum jelenlétében *Candida albicans* izolátumok ellen

Az összes izolátum hasonló növekedést mutatott mindkét tesztelt médiumban, a kontroll egy nagyságrendnyi (1 log) növekedéséhez szükséges idő 8,66-9,77 óra volt RPMI-1640-ben, valamint 8,9-10,89 óra szérum jelenlétében.

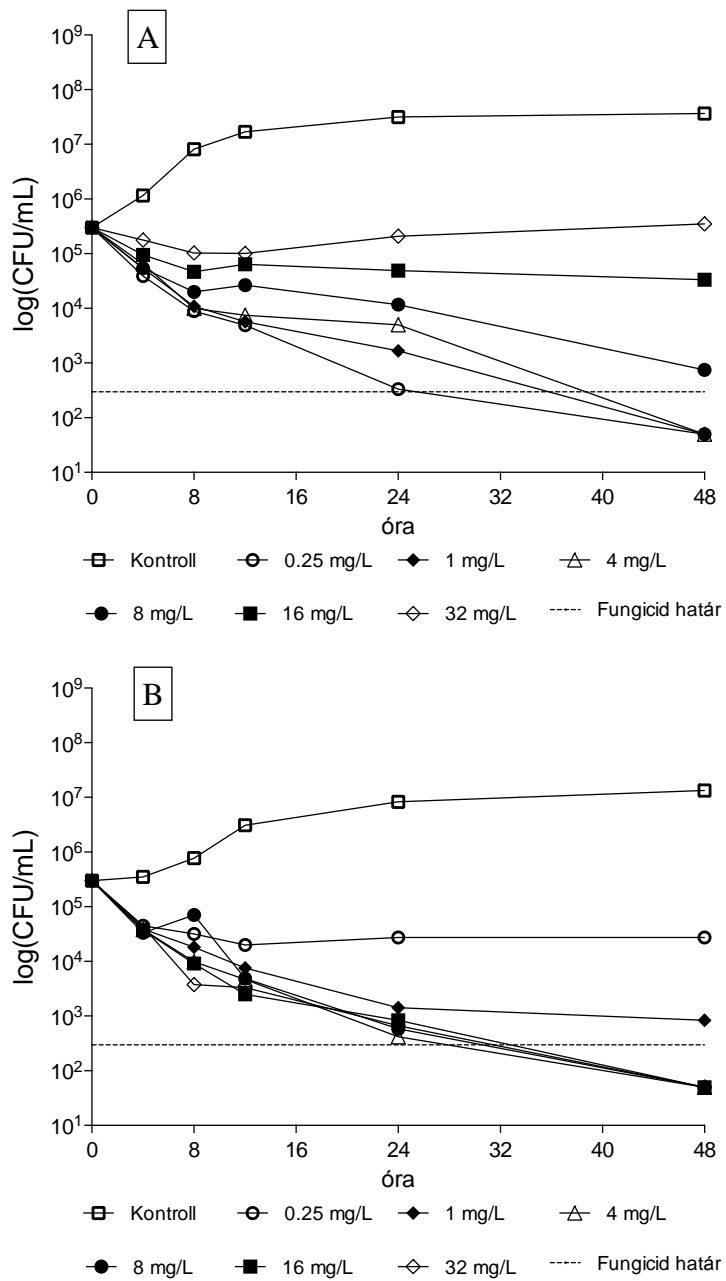
A CAS fungisztikus aktivitást mutatott a 14171 és a 35035 izolátumok ellen RPMI-1640 tápközegben, viszont az alacsonyabb koncentrációkon (0,25 és 1 mg/l) nagyobb mértékű csíraszám csökkenést tapasztaltunk, mint a 16 és 32 mg/l CAS esetében (4A ábra, 4. táblázat). A 18799 izolátum ellen a CAS fungicid hatású volt ≥ 4 mg/l koncentrációkon. Az 5265, a 10781 és a 34350 izolátumok esetében tipikus PG-t figyeltünk meg, mivel az alacsony koncentrációknál fungicid, a magas koncentrációknál (16 és 32 mg/l) fungisztikus aktivitás volt látható (5A ábra, 4. táblázat). Ennél a három izolátumnál a 99,9%-os csíraszám csökkenéséhez szükséges idő < 12 óra volt az 1-8 mg/l koncentrációkon (5. táblázat).

A CAS 50% humán szérummal kiegészített tápközegben gátolta a 14171, a 18799 és a 35035 izolátumok növekedését, 99,9%-os csíraszám csökkenést azonban egyik koncentrációval sem sikerült elérni (4B ábra). A CAS ölési aktivitása 50% szérumban erősebb volt mindhárom, RPMI-1640-ben PG-t mutató izolátum ellen, ugyanis 4-32 mg/l koncentrációkon már 10 órán belül fungicid hatást tapasztaltunk (5B ábra, 5. táblázat).

4. ábra. A caspofungin reprezentatív idő-ölés görbéi a 14171-es *C. albicans* izolátum ellen RPMI-1640 (A), valamint 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640 tápközegben (B)



5. ábra. A caspofungin reprezentatív idő-ölés görbéi a 10781-es *C. albicans* izolátum ellen RPMI-1640 (A), valamint 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640 tápközegben (B)



4. táblázat. A kiindulási inokulumhoz mért maximális csíraszám csökkenés (CFU/ml) RPMI-1640, valamint RPMI-1640+50% humán szérumban jelenléte során idő-ölés kísérletek során *Candida albicans* izolátumok esetén

Izolátum	Tápközeg	Az idő-ölés kísérletek során a különböző CAS koncentrációknál (mg/l) tapasztalható maximális csíraszám csökkenés (log)					
		0,25	1	4	8	16	32
14171	RPMI-1640	-1,68	-1,12	-1,20	-1,38*	-0,69	-0,88
	50% szérumban	-0,90*	-1,13	-1,43	-1,38*	-1,38	-1,68
18799	RPMI-1640	-2,60	-2,78	-3,00	-3,00	-3,00	-3,00
	50% szérumban	-0,89	-1,48	-1,71	-1,27	-1,88	-1,81
35035	RPMI-1640	-1,48	-2,68	-2,15	-1,15	-0,02	-0,38
	50% szérumban	-0,83*	-1,13	-2,10	-2,60	-1,38	-2,78
5265	RPMI-1640	-1,97*	-3,60	-3,60	-3,60	-1,68*	-2,08
	50% szérumban	-1,42*	-3,60	-3,60	-3,60	-3,60	-3,60
10781	RPMI-1640	-3,78	-3,78	-3,78	-2,60	-0,95	-0,16*
	50% szérumban	-1,18*	-2,65	-3,78	-3,78	-3,78	-3,78
34350	RPMI-1640	-3,52	-3,52	-3,52	-3,02	-2,09	-0,39*
	50% szérumban	-1,00	-3,52	-3,52	-3,52	-3,52	-3,52

*újránövekedés volt

5. táblázat. A *Candida albicans* izolátumoknál tapasztalt, kiindulási csíraszámhoz viszonyított 99,9%-os csíraszám csökkenéshez szükséges idő (h) különböző caspofungin koncentrációk esetén kétféle tápközegben. A negatív (-) jel azt jelenti, hogy fungicid hatást nem tapasztaltunk.

Izolátum	Tápközeg	Idő (óra)					
		0,25	1	4	8	16	32
14171	RPMI-1640	-	-	-	-	-	-
	50% szérumban	-	-	-	-	-	-
18799	RPMI-1640	-	-	17,31	14,54	12,56	24,53
	50% szérumban	-	-	-	-	-	-
35035	RPMI-1640	-	-	-	-	-	-
	50% szérumban	-	-	-	-	-	-
5265	RPMI-1640	-	10,18	11,38	11,83	-	-
	50% szérumban	-	8,96	8,27	9,68	8,08	8,48
10781	RPMI-1640	8,82	3,12	4,48	-	-	-
	50% szérumban	-	-	3,06	3,11	3,11	3,27
34350	RPMI-1640	3,27	3,26	5,17	5,87	-	-
	50% szérumban	-	5,08	5,61	4,94	4,85	5,31

Eredményeink alapján a csíraszám csökkenés izolátum-, koncentráció- és tápközegfüggő volt, emellett néhány izolátumnál mindkét táptalajban újránövekedés látható.

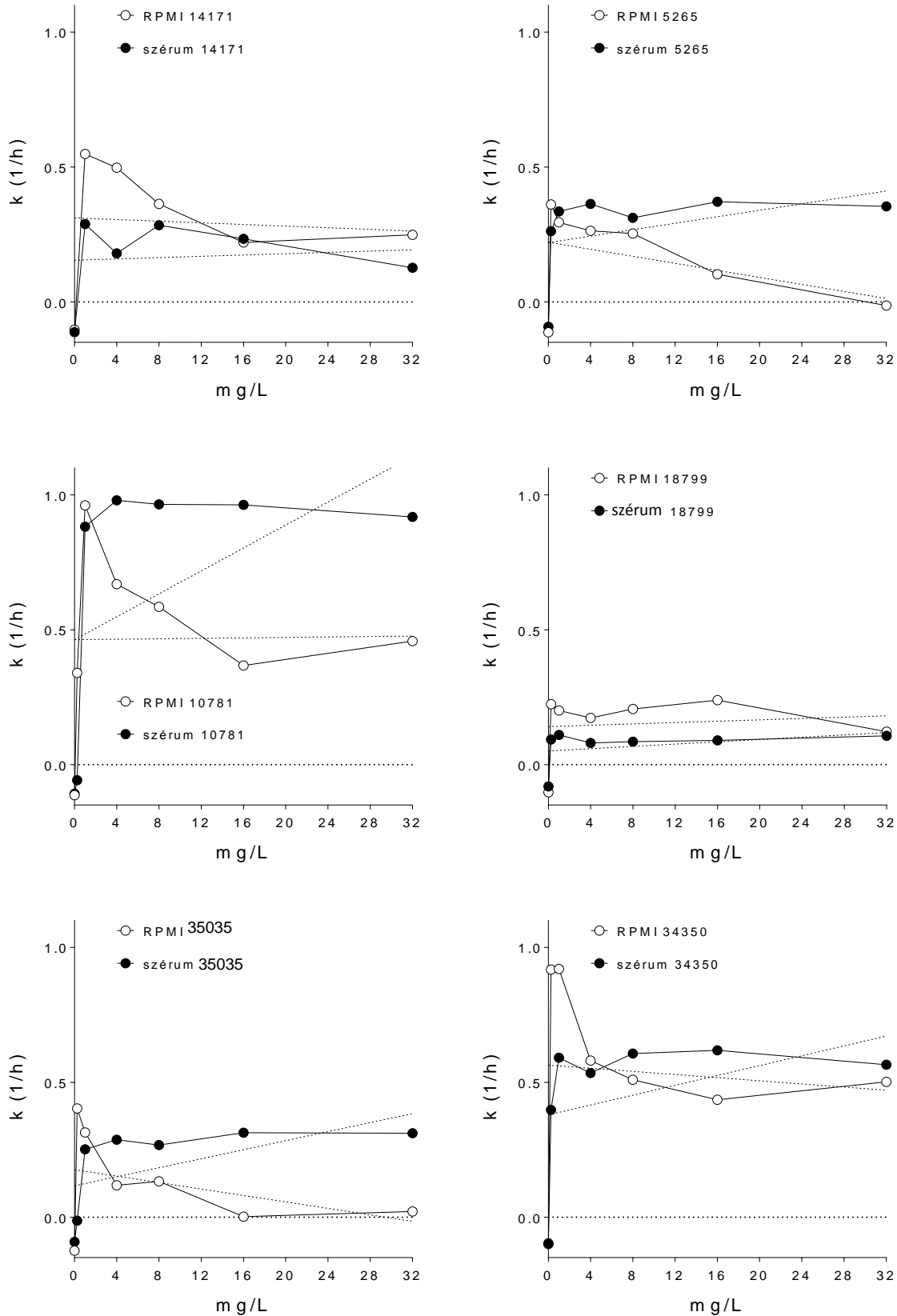
5.3. A caspofungin ölési rátájának meghatározása *Candida albicans* izolátumok ellen

A CAS ölési rátája RPMI-1640 tápközegben izolátum- és koncentrációfüggőnek bizonyult. Érdekes tendenciát figyeltünk meg az izolátumok között, ugyanis az alacsonyabb koncentrációkhoz (0,25 vagy 1 mg/l) tartozó k értékek magasak voltak, míg a 32 mg/l CAS-nál alacsony k értékeket kaptunk. Az összes izolátumot tekintve az 1 mg/l CAS szignifikánsan nagyobb k értéket eredményezett, mint a 16 és a 32 mg/l ($p < 0,001$). Ez a paradox hatás a 35035 és az 5265 izolátumoknál volt a leglátványosabb, ahol az 1 mg/l CAS esetén mért ölési ráta 0,314 1/h és 0,295 1/h volt, szemben a 32 mg/l CAS-nál kapott 0,021 1/h, valamint 0,011 1/h értékekkel. A legmagasabb k érték a 10781-es izolátum ellen 1 mg/l-nél látható (0,961 1/h) (6. ábra).

Ötven százalék humán szérummal kiegészített RPMI-1640-ben 0,25 mg/l CAS-nál a 14171, 35035 és a 10781 izolátumok esetében negatív ölési rátát (növekedés) lehetett megfigyelni. Ugyanezen a koncentráción a többi izolátumnál 0,093-0,398 1/h között voltak a k értékek. Egy izolátumtól eltekintve az ölési ráták 1-32 mg/l koncentrációkon koncentráció függetlenek voltak. A k értékek között jelentős eltérések mutatkoztak, a legalacsonyabb a 18799-es izolátum (0,085-0,109 1/h), a legmagasabb a 10781-es izolátum (0,882-0,985 1/h) esetében volt. A többi izolátumtól eltérően a 14171-es izolátum esetén az 1, 4, 8 és 16 mg/l CAS-hoz tartozó k értékek szignifikánsan magasabbak voltak (0,241-0,271 1/h), összehasonlítva a 32 mg/l CAS-nal (0,126 1/h) ($p < 0,05-0,001$) (6. ábra).

Ugyanazon CAS koncentrációk ölési kinetikáját összehasonlítottuk a kétféle tápközegben. Az összes izolátum esetében a 0,25 mg/l CAS-nál mérhető k értékek magasabbak voltak RPMI-1640-ben, mint szérum jelenlétében ($p < 0,05-0,001$). A 14171 és 18799 izolátumok esetében a k értékek magasabbak voltak az összes vizsgált koncentráción normál (RPMI-1640) tápközegben, mint 50% szérumban. Ez alól kivétel csupán a 14171-es izolátumnál a 16 mg/l CAS esetén mért, illetve a 18799-es izolátumnál a 32 mg/l CAS mellett kapott k érték volt ($p < 0,05-0,001$). A többi izolátum esetében a CAS aktivitása fokozódott 4-32 mg/l koncentrációkon 50% szérumban ($p < 0,05-0,001$). Ettől eltérő eredményt csak a 8 mg/l CAS-nal tapasztaltunk az 5265-ös izolátum ellen, valamint a 4 és 32 mg/l CAS esetén a 34350-es izolátumnál.

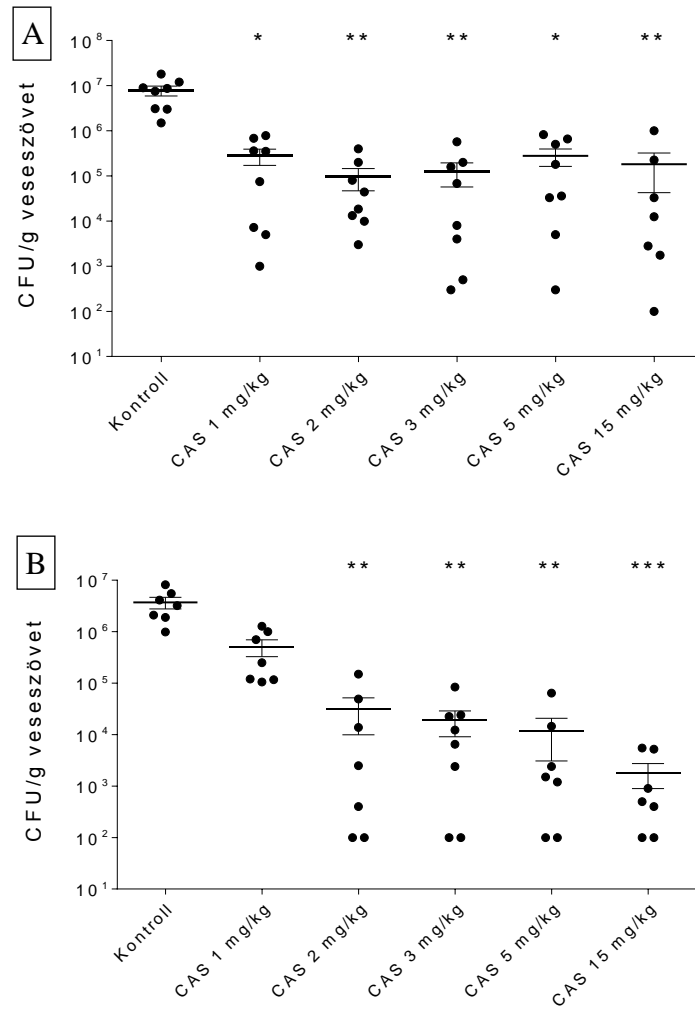
6. ábra. A caspofungin ölési rátája (k) 6 *Candida albicans* klinikai izolátum ellen RPMI-1640-ben (RPMI) és 50% humán szérumban (szérumban) jelenlétében. Az ábrákon a szaggatott vonal a regressziós egyenest jelöli. A pozitív k érték az élő sejtek számának a csökkenését, a negatív k érték azok növekedését jelenti.



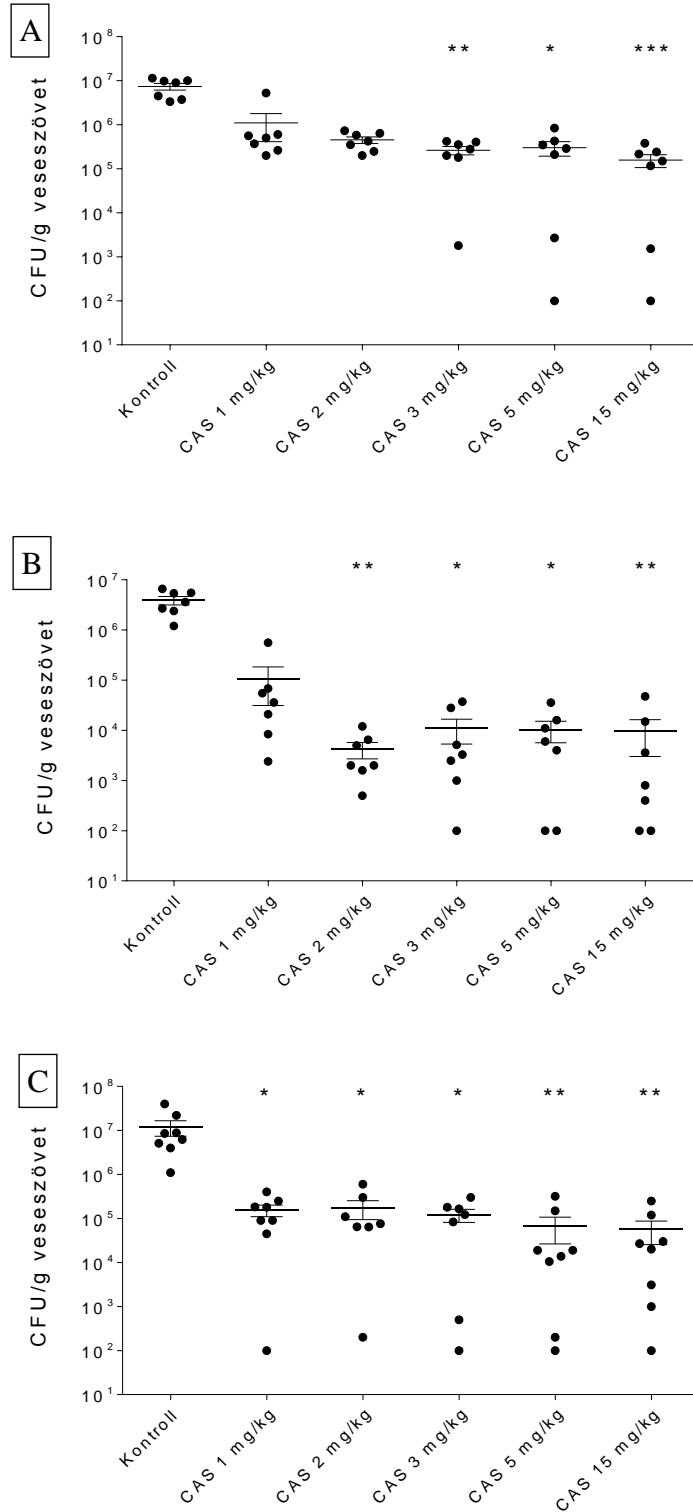
5.4. A caspofungin *in vivo* hatékonyságának vizsgálata *Candida albicans* izolátumok ellen

A kontrollhoz viszonyítva az összes alkalmazott CAS dózis csökkentette a vesékből kitenyésztett élő gombasejtek számát a klinikai izolátumoknál, azonban ez a csökkenés nem minden esetben volt szignifikáns. A napi 1 mg/kg CAS dózis nem volt hatékony a 18799, 10781 és a 34350 izolátumok esetében, továbbá a napi 2 mg/kg dózis szintén nem eredményezett szignifikáns csíraszám csökkenést a 10781-es izolátummal történő fertőzés esetén. Ezzel szemben a 3, 5 és 15 mg/kg napi dózisok minden izolátum ellen hatékonyak bizonyultak ($p < 0,05-0,001$). Három izolátumnál (18799, 5265 és 10781) a legnagyobb CAS dózisonál figyeltük meg a legnagyobb mértékű csíraszám csökkenést. A 14171 és 34350 izolátumok esetében a legalacsonyabb csíraszám a napi 2 mg/kg CAS kezelés után, a 35035 izolátumnál pedig a napi 3 mg/kg-os terápia után tenyésztett ki. A hatékony dózisok között szignifikáns különbséget azonban nem tapasztaltunk (7. ábra, 8. ábra).

7. ábra. A caspofungin *in vivo* hatékonysága a *Candida albicans* 14171 (A) és a 18799 (B) izolátummal fertőzött neutropéniás egérmodellben. A vesékből kitenyészített csíraszám logaritmusát a vizsgált dózisok függvényében ábrázoltuk.
 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)



8. ábra. A caspofungin *in vivo* hatékonysága a *Candida albicans* 10781 (A), 34350 (B) és az 5265 (C) izolátummal fertőzött neutropéniás egérmodellben. A vesékből kitenyésztett csíraszám logaritmusát a vizsgált dózisok függvényében ábrázoltuk.
 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)



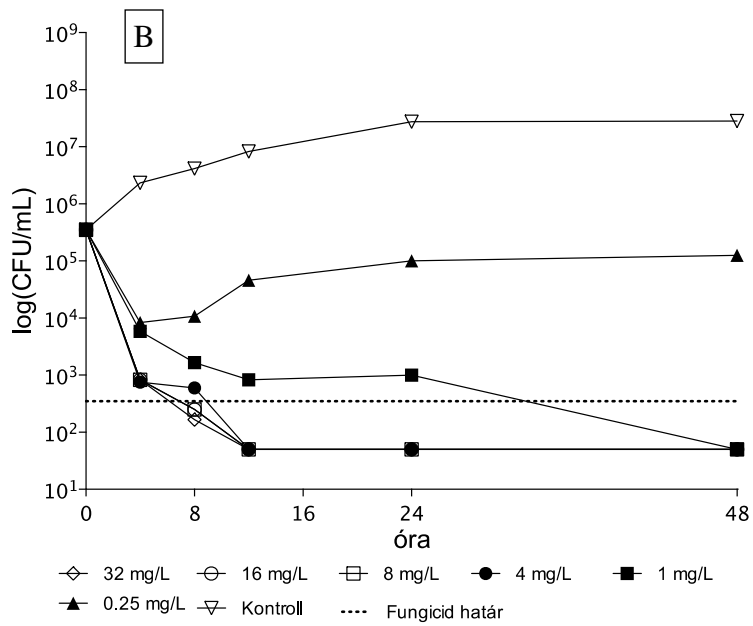
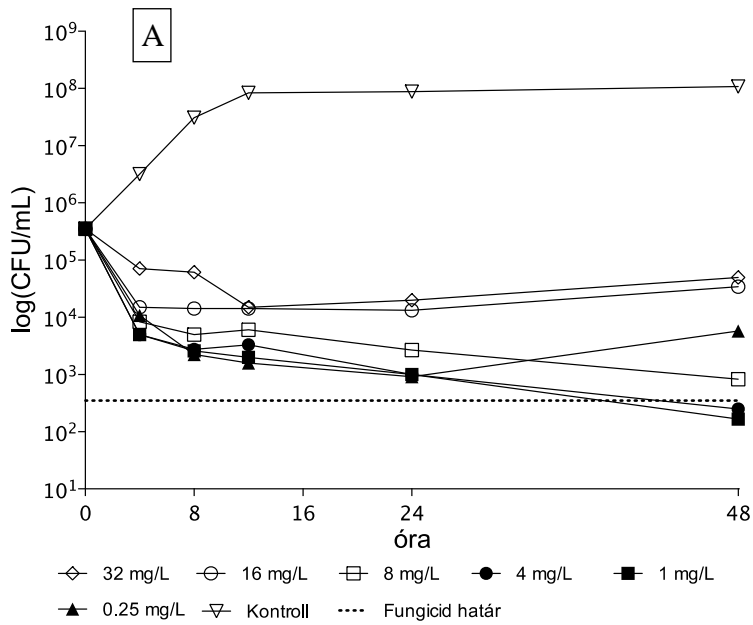
5.5. Az idő-ölés kísérletek eredményei RPMI-1640 és RPMI-1640+50% humán szérum jelenlétében *Candida glabrata* izolátumok ellen

Az összes vizsgált *C. glabrata* izolátum szignifikánsan jobb növekedést mutatott RPMI-1640-ben, mint a szérumot tartalmazó tápközegben. A klinikai izolátumok vizsgálata során a gyógyszermentes kontroll egy nagyságrendnyi (1 log) növekedéséhez szükséges átlag idő RPMI-1640 tápközegben 8,14 óra, míg a szérummal kiegészített tápközegben 11,17 óra volt. A rezisztens izolátumok esetében ehhez a növekedéshez normál tápközegben 8,57-8,95 óra, valamint 50% humán szérum jelenlétében 14,76-14,86 óra kellett.

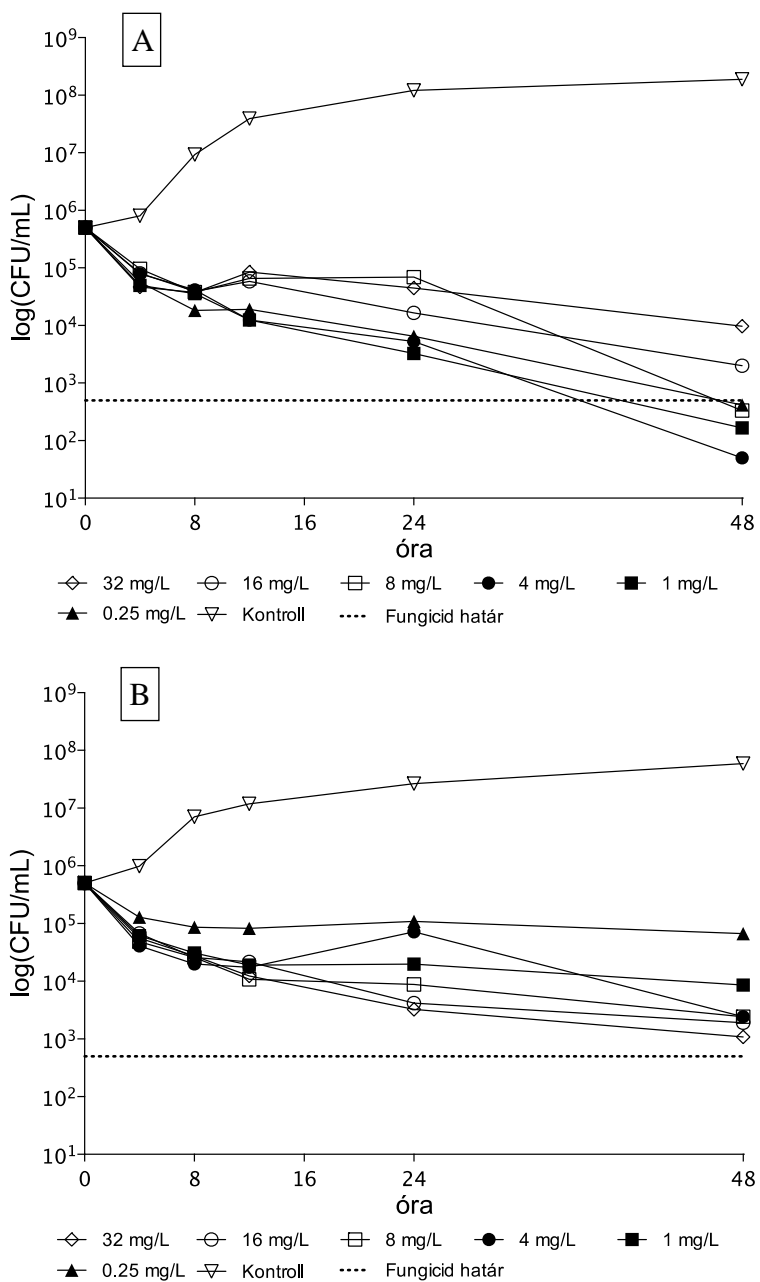
RPMI-1640-ben a 16, valamint a 32 mg/l ölési aktivitásához viszonyítva a CAS hatékonyabb volt 1 és 4 mg/l koncentrációkon az összes tesztelt klinikai izolátum ellen (9A. ábra, 10A. ábra, 6. táblázat). A kezdő inokulumhoz képest a 99,9%-os csökkenés kevesebb, mint 7 óra alatt bekövetkezett a 9098, 18910, 15242 és az ATCC tesztörzs esetén (7. táblázat). A 16 és 32 mg/l CAS fungisztatikus aktivitást mutatott a DPL27 echinocandin rezisztens izolátum ellen (11A. ábra). A másik, szintén rezisztens izolátum esetén (DPL245) azonban csak gyenge, átmeneti fungisztatikus hatást tapasztaltunk az első 8 órában 32 mg/l CAS mellett (6. táblázat).

Szérumot tartalmazó tápközegben a fungicid hatás elérése szignifikánsan rövidebb idő alatt ($\leq 3,32$ óra) valósult meg. A CAS ölési aktivitása 32 mg/l koncentráción jobb volt, mint RPMI-1640-ben, beleértve a rezisztens DPL27-es izolátumot is (9B. ábra, 10B. ábra, 11B. ábra, 6. táblázat).

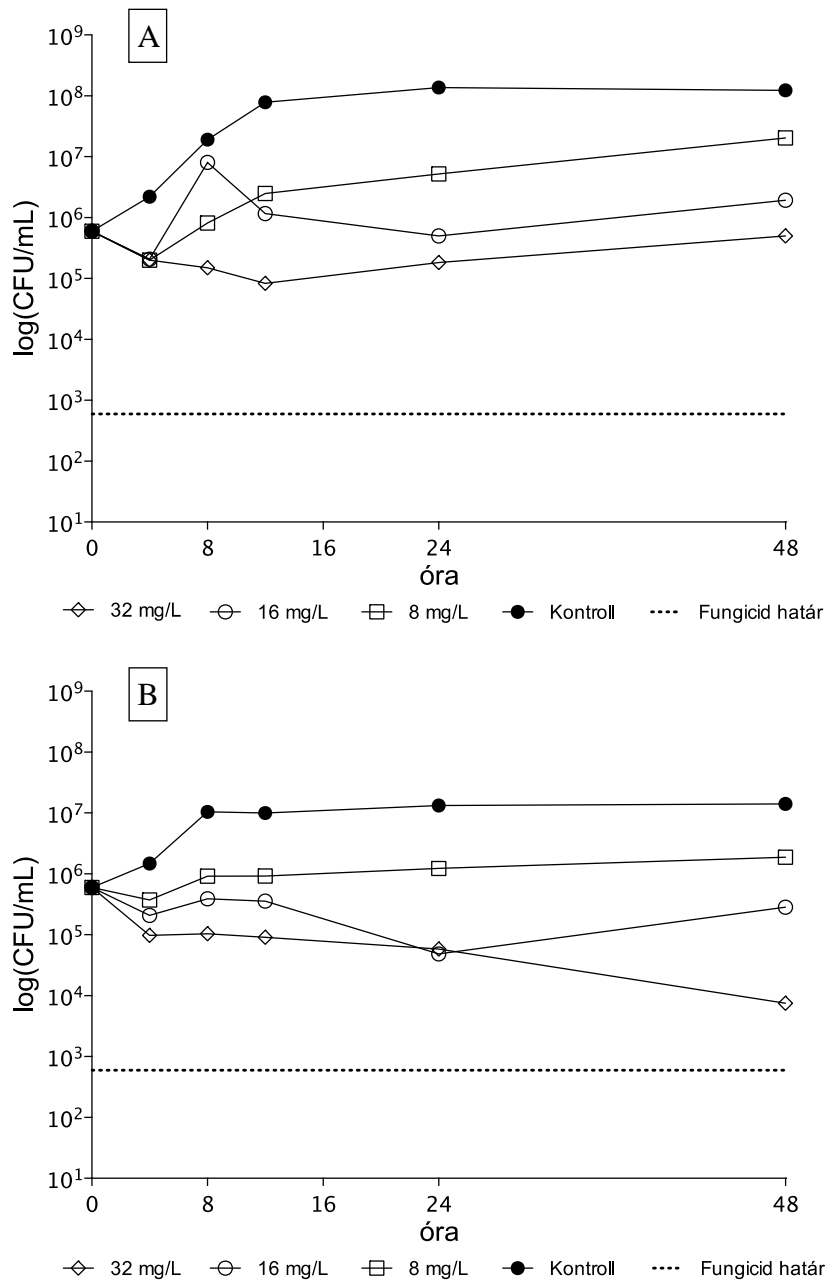
9. ábra. A caspofungin reprezentatív idő-ölés görbéi a 9098-as *C. glabrata* izolátum ellen RPMI-1640 (A), valamint 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640 tápközegben (B)



10. ábra. A caspofungin reprezentatív idő-ölés görbéi a 15242-es *C. glabrata* izolátum ellen RPMI-1640 (A), valamint 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640 tápközegben (B)



11. ábra. A caspofungin reprezentatív idő-ölés görbéi a DPL27-es *C. glabrata* izolátum ellen RPMI-1640 (A), valamint 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640 tápközegben (B)



6. táblázat. A kiindulási inokulumhoz mért maximális csíraszám csökkenés (CFU/ml) RPMI-1640, valamint RPMI-1640+50% humán szérumban jelenléteben idő-ölés kísérletek során *Candida glabrata* izolátumok esetén

Izolátum	Tápközeg	Az idő-ölés kísérletek során a különböző CAS koncentrációknál (mg/l) tapasztalható maximális csíraszám csökkenés (log)					
		0,25	1	4	8	16	32
ATCC 90030	RPMI-1640	-0,66	-3,60	-3,60	-3,60	-3,60	-3,60
	50% szérumban	-1,70	-3,60	-3,60	-3,60	-3,60	-3,60
11900	RPMI-1640	-1,67*	-4,00	-4,00	-4,00	-4,00	-4,00
	50% szérumban	-0,01*	-1,48	-1,71	-1,27	-1,88	-1,81
9098	RPMI-1640	-1,78	-3,35	-3,15	-2,62	-1,02	-0,85
	50% szérumban	-1,62*	-3,85	-3,85	-3,85	-3,85	-3,85
18910	RPMI-1640	-3,85	-3,85	-3,85	-2,30	-1,40	-1,19
	50% szérumban	-0,42*	-3,85	-3,85	-3,85	-3,85	-3,85
15242	RPMI-1640	-3,08	-4,00	-4,00	-3,18	-2,39	-1,71
	50% szérumban	-0,78	-1,76	-2,31	-2,31	-2,42	-2,67
DPL27	RPMI-1640	ND	ND	ND	-0,48*	-0,46	-0,86
	50% szérumban	ND	ND	ND	-0,20*	-1,08*	-1,90
DPL245	RPMI-1640	ND	ND	ND	G	G	-0,08*
	50% szérumban	ND	ND	ND	G	G	G

*újranövekedés látható

ND-nem végeztük el

G-növekedés

7. táblázat. A *Candida glabrata* izolátumoknál tapasztalt, kiindulási csíraszámhoz viszonyított 99,9%-os csíraszám csökkenéshez szükséges idő (h) különböző caspofungin koncentrációk esetén kétféle tápközegben. A negatív (-) jel azt jelenti, hogy fungicid hatást nem tapasztaltunk.

Izolátum	Tápközeg	Idő (óra)					
		0,25	1	4	8	16	32
ATCC 90030	RPMI-1640	3,07	3,07	3,93	4,47	5,48	4,42
	50% szérumban	-	2,94	2,94	2,93	2,10	2,61
11900	RPMI-1640	-	-	-	-	-	-
	50% szérumban	-	3,32	2,78	2,61	2,61	2,61
9098	RPMI-1640	-	3,73	4,48	-	-	-
	50% szérumban	-	2,94	1,95	1,99	1,99	1,99
18910	RPMI-1640	3,31	3,23	3,14	-	-	-
	50% szérumban	-	3,30	2,83	1,99	1,95	2,43
15242	RPMI-1640	5,67	5,53	6,96	7,98	-	-
	50% szérumban	-	-	-	-	-	-
DPL27	RPMI-1640	ND	ND	ND	-	-	-
	50% szérumban	ND	ND	ND	-	-	-
DPL245	RPMI-1640	ND	ND	ND	-	-	-
	50% szérumban	ND	ND	ND	-	-	-

ND-nem végeztük el

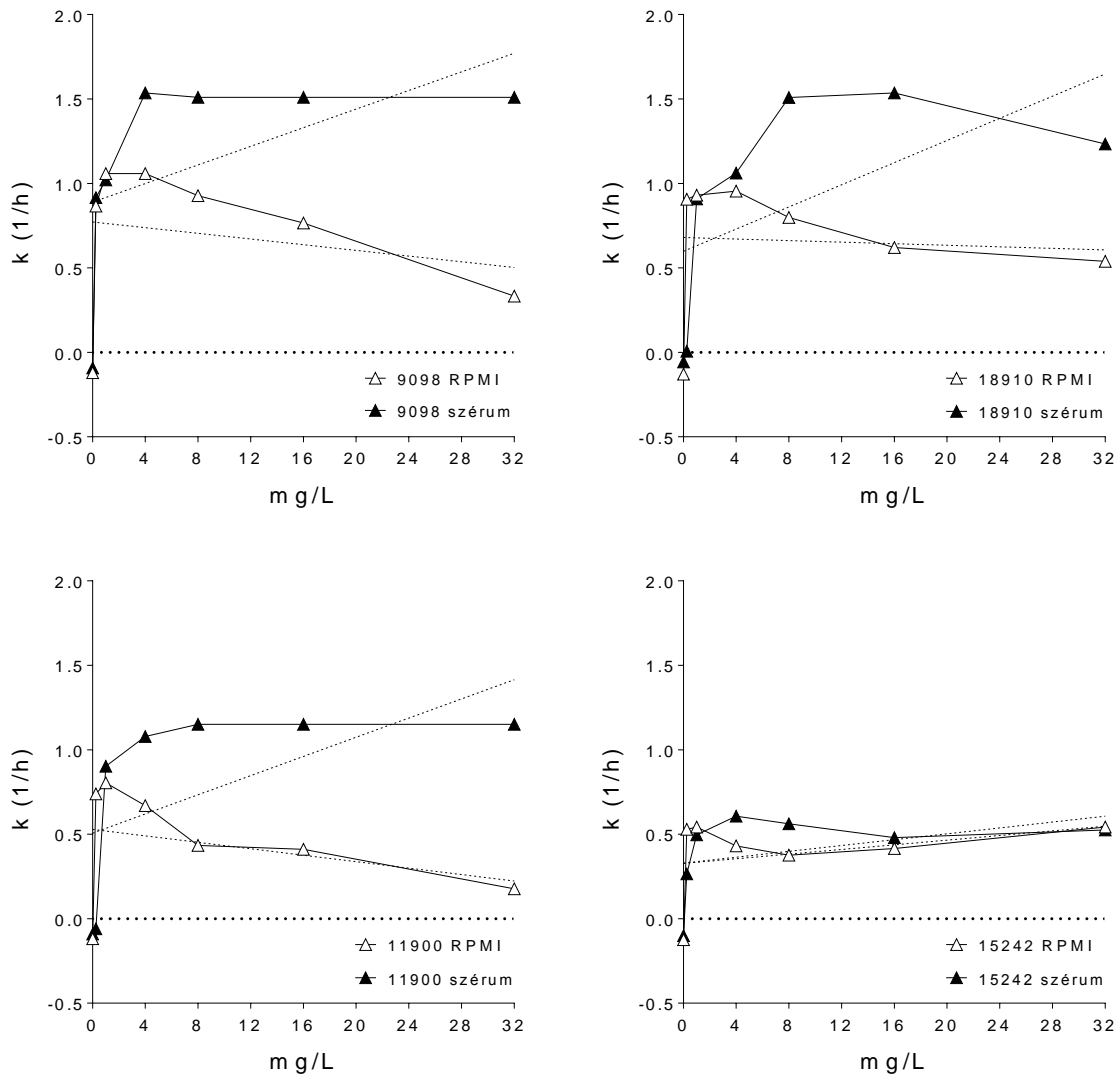
5.6. A caspofungin ölési rátájának meghatározása *Candida glabrata* izolátumok ellen

A 11900, 18910 és 9098 klinikai izolátumok, valamint az ATCC 90030 törzs esetében RPMI-1640-ben a 0,25 és 1 mg/l CAS koncentrációkon kifejtett ölési ráta nagyobb volt, mint a 16, illetve 32 mg/l CAS-nál ($p < 0,05-0,001$). A 15242-es izolátumnál szintén az alacsony koncentrációkon (0,25 és 1 mg/l) figyelhető meg a magasabb k értékek, emellett hasonló ölési ráta látható a 32 mg/l-nél is. A legnagyobb k értéket a 9098-as izolátum ellen tapasztaltuk 1 mg/l, illetve 4 mg/l CAS esetén (1,058 1/h), a legalacsonyabbat pedig a 11900-as izolátum esetén 32 mg/l-nél (0,177 1/h). A két echinocandin rezisztens törzs esetén minden koncentráción növekedést figyeltünk meg (k értékek negatívak voltak), kivéve a 32 mg/l CAS-t a DPL27-es izolátumnál (0,204 1/h) (12. ábra, 13. ábra).

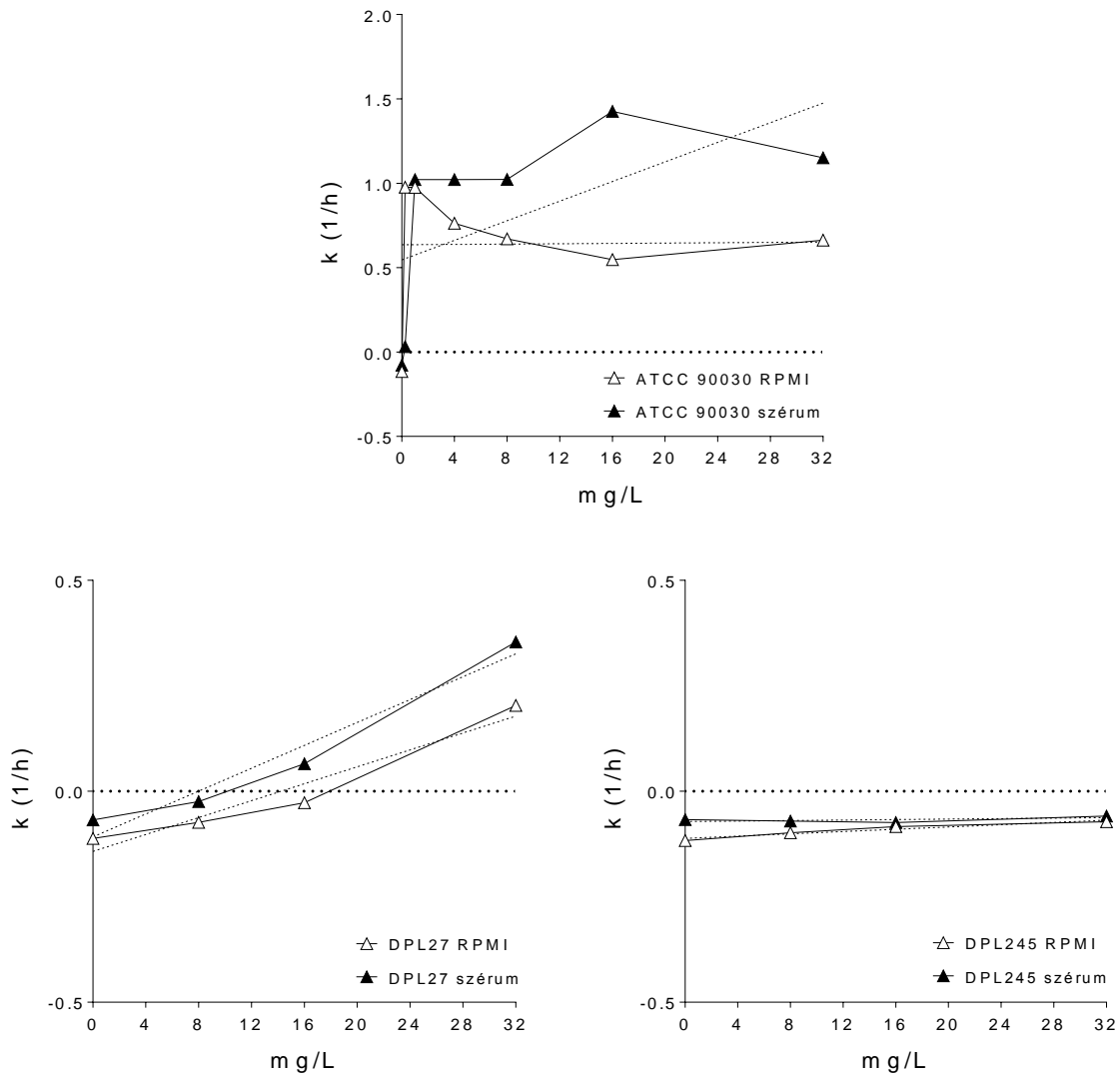
Szérumot tartalmazó tápközegben a 0,25 mg/l-nél megfigyelt k értékek széles tartományban mozogtak. Ez a koncentráció negatív k értéket eredményezett a 11900-as izolátum esetében (-0,059 1/h), míg a többi klinikai izolátumnál, valamint az ATCC 90030 tesztörzsnél a k értékek pozitívak voltak. A 4-32 mg/l koncentrációkon az ölés koncentráció független módon történt a klinikai izolátumok esetében. A tesztörzsnél a legnagyobb k értéket a 16 mg/l CAS esetén mértük (1,426 1/h), az 1, 4, 8 és 32 mg/l CAS-nál megfigyelt k értékek szignifikánsan nem különböztek egymástól (1,022-1,085 1/h). A DPL245-ös izolátumnál a 8-32 mg/l CAS-nál egyaránt növekedést tapasztaltunk, ellenben a DPL27-es izolátumnál a 16 és 32 mg/l CAS-hoz tartozó k értékek 0,065 és 0,354 1/h voltak (12. ábra, 13. ábra).

A 0,25 mg/l CAS-nál mért ölési ráta minden izolátum (kivéve a 9098-as *C. glabrata*) esetében nagyobb volt RPMI-1640-ben, mint 50% humán szérummal kiegészített tápközegben ($p < 0,05-0,001$). Három klinikai izolátum és a referencia törzs esetében a CAS ölési aktivitása szérumban szignifikánsan nagyobb volt a 4-32 mg/l koncentrációkon az RPMI-1640 tápközegben megfigyelt öléssel összehasonlítva ($p < 0,05-0,001$). Hasonlót tapasztaltunk a 15242-es izolátumnál is, azonban a 32 mg/l CAS aktivitása nem különbözött jelentősen a két tápközegben. A DPL27-es izolátum esetében a 16 és 32 mg/l CAS-hoz tartozó k értékek szintén szignifikánsan magasabbak voltak 50% szérumot tartalmazó tápközegben (12. ábra, 13. ábra).

12. ábra. A caspofungin ölési rátája (k) 4 *Candida glabrata* klinikai izolátum ellen RPMI-1640-ben (RPMI) és 50% humán szérumban (szérumban) jelenlétében. Az ábrákon a szaggatott vonal a regressziós egyenest jelöli. A pozitív k érték az élő sejtek számának a csökkenését, a negatív k érték azok növekedését jelenti.



13. ábra. A caspofungin ölési rátája (k) a *Candida glabrata* ATCC 90030 referencia törzs, valamint két echinocandin rezisztens (DPL27 és DPL245) izolátum ellen RPMI-1640-ben (RPMI) és 50% humán szérum (szérum) jelenlétében. Az ábrákon a szaggatott vonal a regressziós egyenest jelöli. A pozitív k érték az élő sejtek számának a csökkenését, a negatív k érték azok növekedését jelenti.



5.7. A caspofungin *in vivo* hatékonyságának vizsgálata *Candida glabrata* izolátumok ellen

Echinocandin rezisztens *C. glabrata* izolátumokkal fertőzött neutropeniás egérmódelben a kísérleteink kezdetén alkalmazott fertőző inokulum 5 napon belül 100% mortalitást eredményezett. A DPL27-es izolátum esetén a fertőzést követő első napon detektált $6,8 \times 10^7$ sejtszám az ötödik napon már $4,3 \times 10^8$ CFU/gramm veseszövet volt. Hasonló arányú sejtszám növekedést figyeltünk meg a DPL245-ös izolátum esetében is ($7,2 \times 10^6$ sejtszámról $6,8 \times 10^7$ sejtre). Ezzel ellentétben az érzékeny izolátumokkal fertőzött egerek a kísérlet végéig életben

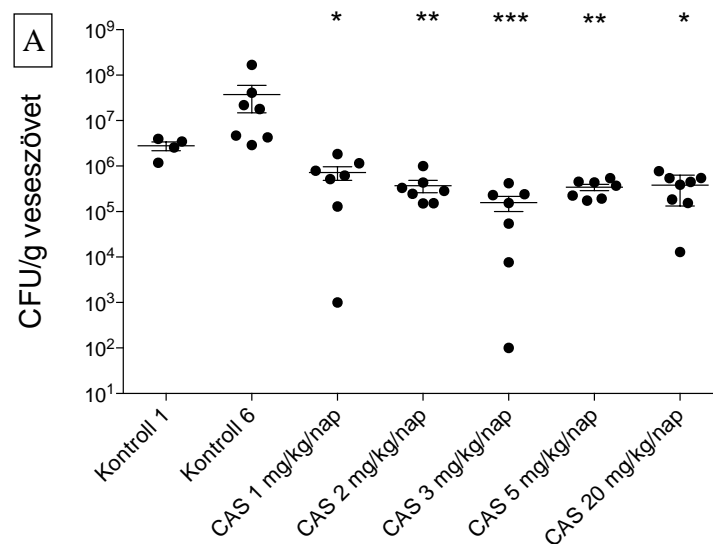
maradtak, a veséikből a fertőzés utáni 6. napon átlagosan 1 gramm veseszövetben 10^7 és 10^8 CFU tenyésztett ki. Emiatt a rezisztens izolátumoknál alacsonyabb fertőző inokulumot alkalmaztunk.

A kezelés kezdetén (a fertőzést követő 1. nap, Kontroll 1) az átlagos, vesékből kitenyésztett csíraszám $4,4 \times 10^6$ - $6,7 \times 10^6$ gombasejt/gramm között volt a klinikai izolátumok, valamint $9,7 \times 10^6$ - $1,4 \times 10^7$ gombasejt/gramm a rezisztens izolátumok esetén. A 11900-as izolátum kivételével mindegyik izolátum kevesebb, mint egy nagyságrendnyit növekedett a kísérlet végéig (Kontroll 6) (14. ábra, 15. ábra).

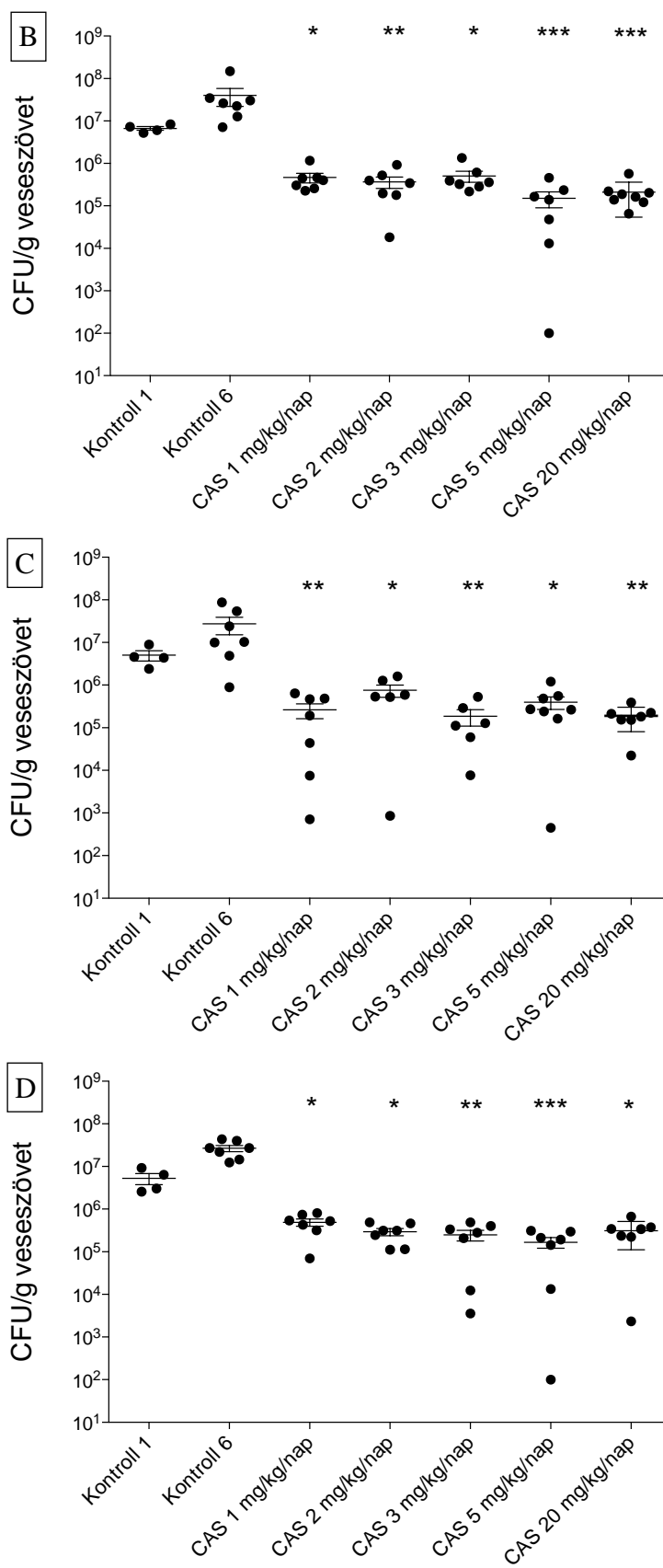
Az összes alkalmazott CAS dózis szignifikánsan csökkentette a vesékből kitenyésztett élő sejtek számát a kontroll csoporttal összehasonlítva a klinikai izolátumok esetében. A dózisok között statisztikailag szignifikáns különbség nem volt, az átlagos csíraszám azonban egyik esetben sem csökkent 10^5 sejt/gramm alá (14. ábra). Az echinocandin rezisztens törzsek ellen a CAS nem volt hatékony, még a legnagyobb dózissal sem (napi 20 mg/kg) értünk el szignifikáns csíraszám csökkenést. A DPL27-es izolátum esetén az egynapos kontrollhoz viszonyítva növekedés gátlást értünk el az összes tesztelt dózissal (15. ábra).

14. ábra. A caspofungin *in vivo* hatékonysága a *Candida glabrata* 11900 (A), 18910 (B), 9098 (C) és a 15242 (D) izolátummal fertőzött neutropéniás egérmodellben. A vesékből kitenyésztett csíraszám logaritmusát a vizsgált dózisok függvényében ábrázoltuk.

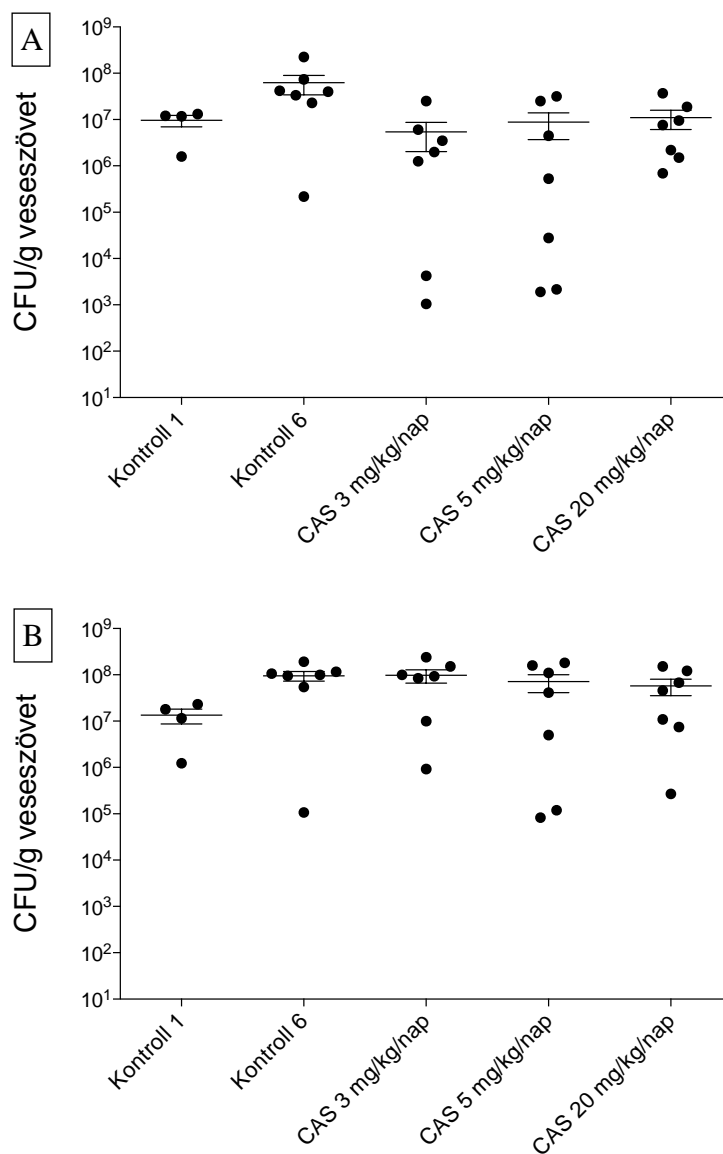
(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)



A 14. ábra folytatása



15. ábra. A caspofungin *in vivo* hatékonysága a *Candida glabrata* DPL27 (A) és DPL245 (B) izolátummal fertőzött neutropéniás egérmodellben. A vesékből kitenyésztett csíraszám logaritmusát a vizsgált dózisok függvényében ábrázoltuk.
 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)



6. Megbeszélés

A *Candida* fajokat a negyedik leggyakoribb véráramfertőzést okozó patogénként tartják számon az USA-ban; míg Európában a hetedik helyen állnak (Wisplinghoff és mtsai. 2004, Marchetti és mtsai. 2004, Delaloye és Calandra 2014). A *Candida* fertőzésekhez köthető mortalitási arány az alapbetegség súlyossága, valamint az antimikotikum kiválasztása mellett függ az adott *Candida* fajtól is, mivel a *C. krusei* és *C. glabrata* esetében magasabb arányról számoltak be (50-70%), mint a *C. parapsilosis* esetében (20-30%) (Pfaller és Diekema 2007, Pfaller és mtsai. 2012, Horn és mtsai. 2009, Lortholary és mtsai. 2014). Habár a szisztémás *Candida* fertőzések kezelésére alkalmas antifungális szerek az echinocandinokkal bővültek a 2000-es évek elején, a mortalitás alapvetően nem csökkent. Ráadásul a Lortholary és munkatársai által készített felmérés szerint a candidaemia incidenciája, illetve az azzal kapcsolatos halálozás szignifikánsan megemelkedett az intenzív osztályokon, főleg a *C. albicans*, valamint a *C. glabrata* okozta fertőzéseket tekintve. Ez a megfigyelés azért aggasztó, mert az echinocandin felhasználás Franciaországban a 2002 és 2010 közötti időszakban 4,6%-ról 48,5%-ra emelkedett az intenzív osztályon fekvő betegek körében (Lortholary és mtsai. 2014). Ezek az adatok rávilágítanak arra, hogy az antifungális terápia optimalizálása nemcsak a rezisztenciával rendelkező *Candida* izolátumok esetében fontos, hanem az olyan vad típusú izolátumok esetében is, melyek érzékenyek az antimikotikumokkal szemben.

Kedvező farmakokinetikai és farmakodinámiás tulajdonságai miatt az IDSA (Infectious Diseases Society of America) az echinocandinokat ajánlja az olyan kritikus állapotban lévő betegek kezelésére, akik korábban FLU profilaxisban részesültek, illetve ha az infekciót okozó patogén csökkent FLU érzékenységgel rendelkezik. Emellett az invazív candidiasis empirikus terápiájában az echinocandinok az elsőként választandó szerek (Pappas és mtsai. 2016, Chen és mtsai. 2011, Sipsas és Kontoyiannis 2012).

A leghatékonyabb kezelési stratégia kidolgozása érdekében elengedhetetlen az antifungális szerek farmakológiai tulajdonságainak pontos ismerete. Az echinocandinok hatékonysága a C_{max}/MIC , valamint az AUC/MIC farmakodinámiás paraméterekkel jellemezhető, ennek köszönhetően az egyszeri vagy a napi nagyobb dózisok alkalmazása jobb klinikai kimenetelt eredményezhet (Andes és mtsai. 2010, Gumbo 2007, Lepak és Andes 2014). Mindazonáltal a dózisznövelés jelentőségét egyelőre a klinikai vizsgálatok nem támasztják alá. Betts és munkatársai a jelenleg érvényben lévő CAS terápiás ajánlást (70 mg telítő dózis után napi 50 mg fenntartó dózis) hasonlították össze a napi 150 mg CAS hatékonyságával invazív

candidiasisban szenvedő felnőtt betegek kezelése során. A standard terápiához képest ugyan nagyobb gyógyulási arányt lehetett megfigyelni a napi 150 mg-os dózissal történő terápiával a *C. albicans*, illetve a *C. parapsilosis* okozta fertőzések esetében, azonban az eltérés a két kezelési stratégia között nem volt szignifikáns (Betts és mtsai. 2009). Hasonlót figyeltünk meg korábbi, neutropéniás egérmodellben elvégzett kísérleteinkben, miszerint nem indokolt a nagyobb CAS dózisok alkalmazása *C. krusei* és *C. inconspicua* izolátumok ellen (Kovács és mtsai. 2014). Érdekes viszont, hogy a „*psilosis*” csoport tagjai által okozott invazív candidiasis kezelése során ugyanolyan összdózisokat alkalmazva az egyszeri, nagy dózisú CAS több esetben hatékonyabb volt, mint a napi, kisebb dózisok (Berényi és mtsai. 2014).

Az echinocandinok nagyfokú fehérjekötő képessége alapvetően befolyásolja a farmakodinámiai sajátosságait. A szervezetben a szérumfehérjékhez való kötődést megfelelően tudjuk modellezni, ha az *in vitro* kísérletekben 50% humán szérumot adunk a tápközeghez. Fontos azonban, hogy a standardizálási nehézségek miatt a szérumhasználaton alapuló érzékenységi módszerek jelenleg még nem alkalmazhatók a rutin diagnosztikában (Chen és mtsai. 2011, Nasar és mtsai. 2013).

In vitro kísérletekben magas echinocandin koncentráció jelenlétében egyes *Candida* fajok MIC érték feletti növekedést (paradox növekedés) mutatnak, holott a gyógyszer alacsony koncentrációban fungicid hatást fejt ki (Vanstraelen és mtsai. 2013). Ez a jelenség feltehetően nem releváns a terápia során, mivel 50% humán szérum jelenlétében nem tapasztalható, mindenesetre kérdéseket vet fel a nagy dózisú CAS klinikai hatékonyságát illetően (Shields és mtsai. 2011, Walker és mtsai. 2013).

A rutin érzékenységi vizsgálatokban sem a CLSI, sem az EUCAST nem ajánlja a CAS MIC értékének meghatározását a különböző *Candida* fajok ellen, mivel az RPMI-1640 tápközegben mért MIC eloszlás a laboratóriumok között nagyon széles tartományban mozog. A CAS MIC meghatározás E-tesztel sem ajánlott, helyette az adott izolátum MICA vagy ANI MIC értékéből következtethetünk a CAS iránti érzékenységre (Espinel-Ingroff és mtsai. 2013, Arendrup 2013).

Kísérleteinkben kétféle, szérum alapú érzékenységi módszert (standard mikrodilúció és E-teszt) használtunk a vad típusú, valamint az echinocandin rezisztens izolátumok CAS MIC értékének meghatározására. A PG E-tesztel történő detektálása érdekében szilárd RPMI-1640-et, illetve 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640-et alkalmaztunk a *C. albicans* izolátumok esetén. A szérumot tartalmazó E-tesztel leolvasott értékek összhangban voltak a mikrodilúcióval kapott értékekkel ugyanazon tápközegben, következésképpen ez a módszer alkalmazható a CAS MIC értékének meghatározására a *C. albicans* izolátumokkal szemben.

PG egyik izolátumnál sem jelent meg. A szérumból alapú tesztek standardizálását nehezíti a szérumból optimális koncentrációjának megválasztása, az eredete (emberi vagy állati), valamint a költsége (Nasar és mtsai. 2013). A költségek csökkentésére megoldást jelenthet az állati szérumból (szarvasmarha szérumból albumin) alkalmazása a diagnosztikai laborokban, mivel a humán szérumból hasonlóan jól elkülöníti a vad típusú izolátumokat a szerzett rezisztenciával rendelkező izolátumoktól (Garcia-Effron és mtsai. 2011). A szérumból elvégzett érzékenységi tesztek számának növelésével megfelelő adatmennyiség állna rendelkezésre, hogy a CAS esetében új klinikai határértékeket vezessenek be a *Candida* fajok ellen. Ezáltal még eredményesebb lenne a csökkent echinocandin érzékenységgel rendelkező izolátumok azonosítása, valamint a terápia sikertelenség prognózisa.

Cantón és munkacsoportja az echinocandinok ölési rátáját vizsgálták RPMI-1640 tápközegben négy, hemokultúrából származó *C. lusitaniae* izolátum esetében. A vizsgált koncentrációk (0,03-8 mg/l ANI, 0,25-32 mg/l MICA és CAS) között nem tapasztaltak szignifikáns különbséget, tehát az ölési ráta koncentráció függetlennek bizonyult. Az ANI és a MICA hasonló ölési aktivitást mutatott, azonban a 8 mg/l ANI esetében csökkenést figyeltek meg (PG), míg a MICA-nál 2-32 mg/l koncentrációk között kismértékű növekedést detektáltak (statisztikailag nem szignifikáns). Habár a CAS-nal összevetve a MICA és az ANI koncentrációi nagyobb ölési rátát eredményeztek, csak a CAS esetében (≥ 16 mg/l) érték el a fungicid határt 24 óra alatt (Cantón és mtsai. 2012).

A CAS ölési aktivitásának meghatározására irányuló kísérleteinket hat klinikai *C. albicans* izolátummal végeztük el. A kísérletek alatt az izolátumok változatosan viselkedtek RPMI-1640 tápközegben, ugyanis a CAS egy izolátum ellen fungicid, míg két izolátum ellen fungisztikus volt. Ezen felül három izolátumnál figyeltünk meg PG-t az idő-ölés kísérletekben. Az ölési ráták meghatározása során a 16 és 32 mg/l CAS esetén az alacsony *k* értékek a CAS csökkent aktivitását jelezték minden izolátum esetében. A *C. albicans* izolátumoknál CAS jelenlétében előforduló PG-ről több szerző is beszámolt (Varga és mtsai. 2009, Shields és mtsai. 2011, Walker és mtsai. 2013). A *C. glabrata* klinikai izolátumok ölési kinetikáját vizsgálva normál tápközegben szintén a nagy koncentrációkon (16-32 mg/l) tapasztaltunk csökkent aktivitást összehasonlítva a 0,25-1 mg/l CAS esetén elért öléssel. Összességében elmondható viszont, hogy hasonlóan a szakirodalomban megjelent eredményekhez (Fernández-Silva és mtsai. 2014, Spreghini és mtsai. 2012, Gil-Alonso és mtsai. 2015) a CAS kiváló *in vitro* aktivitást mutatott a vad típusú klinikai *C. glabrata* izolátumok és az ATCC 90030 tesztörzs ellen is.

Ötven százalék szérumban MIC érték emelkedést figyeltünk meg, melynek mértéke a *C. albicans* izolátumoknál 2-16-szoros, a *C. glabrata* izolátumoknál 4-8-szoros volt. A nagy koncentrációknál azonban a korábban látható PG megszűnt mindkét előbb említett faj esetében mind a MIC meghatározás, mind az idő-ölés kísérletek során. A *k* értékeket tekintve az 50% humán szérum visszaállította a magasabb CAS koncentrációk ölü aktivitását. Ez alól kivétel csupán a 14171-es *C. albicans* izolátum volt, melynél a 32 mg/l CAS-nál mért ölési ráta nagyobb volt RPMI-1640-ben, mint szérum jelenlétében.

Az 50% humán szérumot tartalmazó tápközegben a CAS ölési rátája az effektív koncentrációkon (ahol csíraszám csökkenés volt megfigyelhető) koncentráció függetlennek bizonyult, vagyis az első hatékony koncentráció elérése után a koncentráció további növelése nem eredményezett szignifikáns mértékű változást a CAS ölési aktivitásában. Ennek hátterében a CAS fehérjekötődése állhat, ezért a CAS koncentrációjának növelésével a farmakológiailag aktív gyógyszer mennyisége nem növekszik olyan mértékben, hogy az ölü aktivitás fokozása következzen be. A *C. albicans* izolátumok esetében 1-32 mg/l között (kivéve a 14171-es izolátum), míg a *C. glabrata*-nál a 4-32 mg/l CAS-nál tapasztaltunk koncentráció független ölési aktivitást. Érdeemes megjegyezni, hogy az átlag *k* érték tartományok az izolátumok között viszont jelentős változatosságot mutattak (0,085-0,109 1/h, illetve 0,882-0,985 1/h).

Az egyes izolátumok esetén RPMI-1640-ben vagy 50% humán szérum jelenlétében a *k* értékek alapján látható jobb ölési aktivitás megjelenését vártuk a neutropéniás egérmodellel elvégzett kísérleteinkben is, főleg a nagyobb dózisok alkalmazásánál. A dózisokat úgy választottuk ki, hogy az elért AUC értékek azonosak legyenek egérben és emberben. Ezek alapján a napi 1 mg/kg dózis a 35 mg-os humán CAS dózissal egyenértékű, a 2 mg/kg/nap dózis megfelel a napi 50 mg humán dózissal. A jelenleg érvényben lévő CAS terápiának a 3 mg/kg/nap egérdózis, a naponta adagolt 70 mg-os dózissal pedig az 5 mg/kg/nap egérdózis felel meg (Stone és mtsai. 2002, Migoya és mtsai. 2011, Flattery és mtsai. 2011).

Az összes általunk vizsgált *C. albicans* klinikai izolátum, valamint a referencia törzs ellen a 3, 5 és 15 mg/kg napi CAS dózisok hatékonyak voltak neutropéniás egérmodellben, ezzel szemben a napi 1 és 2 mg/kg dózisokkal nem minden esetben értünk el szignifikáns csíraszám csökkenést a kontrollhoz képest. A hatékony dózisok között azonban statisztikailag szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk, tehát a dóziszövelés nem fokozta a CAS hatékonyságát. Ezek az adatok megerősítik a CAS koncentráció független viselkedését, melyet az *in vitro* kísérletek során az 50% szérumot tartalmazó tápközegben kaptunk. Normál RPMI-1640-ben, illetve 50% humán szérummal kiegészített RPMI-1640-ben korábban már

összehasonlítottuk a CAS ölési kinetikáját *C. krusei* és *C. inconspicua* klinikai izolátumok esetében. Azokban a kísérletekben is hasonló korrelációt állapítottunk meg a CAS *in vitro* és *in vivo* hatékonysága között (Kovács és mtsai. 2014). Az *in vivo* eredményeink azt is alátámasztják, hogy a PG-nek nincs hatása a CAS *in vivo* hatékonyságára *C. albicans* esetében, mivel a legnagyobb dózis (15 mg/kg/nap) is ugyanolyan hatásos volt, mint a napi 3 és 5 mg/kg CAS dózisok. Fontos megjegyezni, hogy a napi dózisoktól függetlenül 10^4 - 10^6 CFU/gramm élő gombasejt tenyésztett ki az egerek veséiből, mely jól demonstrálja az invazív candidiasis kezelésének nehézségeit a neutropéniás szervezetben.

A *C. albicans* izolátumokkal ellentétben a *C. glabrata* vad típusú izolátumok esetén a CAS már 1 mg/kg/nap dózisban is hatékonynak bizonyult. Számos állatmodellben elvégzett tanulmány írt a CAS kiváló aktivitásáról *C. glabrata* fertőzések esetén (Barchiesi és mtsai. 2005, Fernández-Silva és mtsai. 2014, Arendrup és mtsai. 2012, Olson és mtsai. 2005). Habár kísérleteinkben az összes vizsgált CAS dózis szignifikáns csíraszám csökkenést eredményezett, a csíraszám átlag egyik esetben sem csökkent 10^5 CFU/gramm alá. Azaz a nagy CAS dózisokkal is csak fungisztikus hatás érhető el tartósan neutropéniás egerekben, így a dózisznövelés nem jelent terápiás előnyt az alacsonyabb dózisokkal szemben. A CAS *in vitro* fungicid hatása ellenére a fungisztikus aktivitása *in vivo* nem szokatlan. Spreghini és munkatársai FKS mutációval nem rendelkező *C. glabrata* izolátumok esetében hasonlították össze az echinocandinok *in vivo* aktivitását neutropéniás egérmodellben. Egyik vizsgált gyógyszerdózis, illetve törzs esetében sem tapasztaltak fungicid hatást (a szervek sterilizációja nem valósult meg) (Spreghini és mtsai. 2012). Howard és munkatársai szintén fungisztikus aktivitást figyeltek meg napi 1 mg/kg MICA, illetve CAS és 5 mg/kg ANI alkalmazásakor disszeminált *C. glabrata* fertőzés esetén. A MICA farmakokinetikáját vizsgálva megállapították, hogy az elfogadott kezelési stratégiával (napi 100 mg) is csak növekedésgátló hatást lehet elérni. Egyértelmű fungicid hatást a 400 mg és a 800 mg napi MICA dózisok eredményeztek. Kísérleteikből arra következtettek, hogy dózisznövelés szükséges a maximális antifungális hatás eléréséhez a neutropéniás betegek kezelése során. Eredményeik kapcsán azonban meg kell említeni, hogy alacsony fertőző csíraszámot alkalmaztak (3×10^5 CFU/egér), illetve már a fertőzés után 5 órával elindították az antifungális terápiát (Howard és mtsai. 2011).

Néhány esetben a kedvezőtlen terápiás kimenetel a késleltetett antifungális kezelésnek köszönhető, hiszen a klinikumban az antifungális terápia elindítása több napot is késhet. A kezelés késésének (akár a fertőzést követő 24 óra) következtében a gomba magas szöveti csíraszámot érhet el a súlyos neutropéniában szenvedő betegeknél. A belső szervekbe jutó

kórokozót nehezebb eliminálni, mint csak a vérben jelenlévő patogént. A korai terápiával azonban a kórokozó teljes disszeminációja megakadályozható. Ennek jelentőségét MacCallum és Odds kiválóan szemléltette immunkompetens rágcsáló modellben *C. albicans* okozta disszeminált infekció esetén. A legmagasabb túlélési arányt azokban az esetekben tapasztalták, ahol az állatokat CAS profilaxisban részesítették, vagy ha már a fertőzés napján elkezdték a célzott antifungális terápiát. Ezen kívül a kezelt állatok veséiből kitenyésztett átlag gombasejtszám fokozatosan emelkedett a napok számával, amennyivel később indították a kezelést (MacCallum és Odds 2004). Az állatkísérleteken alapuló eredményeket klinikai tanulmányok is megerősítették (Farmakiotis és mtsai. 2015).

A szérum alapú tápközegben, valamint az *in vivo* modellben megfigyelt adatok szerint az általunk kiválasztott, vérből származó *C. glabrata* izolátumok gyenge szaporodó képességgel rendelkeztek. A lassú *in vivo* növekedés viszonylag alacsony virulenciára utal, ennek ellenére az alkalmazott CAS dózissal nem sikerült elérni a vesék sterilizálását. Az egyik lehetséges magyarázat az echinocandinok hatásmechanizmusán alapszik, mivel a lassabb növekedéssel egyidejűleg lassul a sejtfalszintézis is, melynek következtében gyengül a CAS *in vivo* ölő aktivitása (Chen és mtsai. 2011, Perlin 2014). Emellett természetesen egyéb faktorok is (pl. neutropénia, a gyógyszer gyenge penetrációja a gyulladt szövetekbe) befolyásolhatják a terápia kimenetelét (Farmakiotis és mtsai. 2014, Pfaller és mtsai. 2012). A kevés felhasznált izolátum miatt további vizsgálatok szükségesek annak megállapítására, hogy ennek a gyenge *in vivo* fitnessnek milyen klinikai jelentősége van, illetve jellemző-e minden vérmintából izolált *C. glabrata*-ra.

Habár echinocandin rezisztencia ritkán fordul elő a *Candida* fajok között, a CAS-nal szemben kialakuló másodlagos rezisztencia néhány orvosi központban komoly problémát okoz (Alexander és mtsai. 2013, Beyda és mtsai. 2014, Perlin 2014). A texasi MD Anderson Onkológiai Központban a *C. glabrata*-val fertőzött daganatos betegeknél a CAS rezisztencia aránya 10,3% (146 izolátumból 15 izolátum), az akut leukémiában szenvedő betegeknél 58,3% (12 izolátumból 7 izolátum) volt. Mindkét tanulmány szoros összefüggést állapított meg a CAS rezisztencia és a megemelkedett mortalitási arány között, mely alapján a CAS rezisztens izolátumok virulensebbek az érzékeny izolátumoknál (Farmakiotis és mtsai. 2014, Wang és mtsai. 2015). Ezeket a klinikai megfigyeléseket támasztja alá Borghi és munkatársai kísérlete, melyben egy CAS érzékeny *C. glabrata* klinikai izolátum és a terápia során abból kialakuló, S663P mutációt hordozó izolátumok virulenciáját hasonlították össze állatmodellben (Borghi és mtsai. 2014). Az echinocandin rezisztencia virulenciára kifejtett hatása fajfüggő, mivel az FKS1 mutáns *C. albicans* esetében csökkent fitnesszt és virulenciát

tapasztaltak állatkísérletek során (Ben-Ami és mtsai. 2011). Előzetes kísérleteinkben a CAS rezisztens *C. glabrata* izolátumok virulensebbnek bizonyultak a vad típusú klinikai izolátumokkal összehasonlítva, ugyanis a többi kísérletben alkalmazott $6,6-8,4 \times 10^7$ CFU/egér fertőző csíraszám öt napon belül 100%-os halálozást okozott. Az általunk vizsgált érzékeny és rezisztens izolátumok azonban nem voltak izogének.

A nagy CAS dózisok hatástalannak bizonyultak a prominens FKS mutációval rendelkező izolátumok ellen. A *C. glabrata* izolátumoknál az echinocandin rezisztencia gyorsan kifejlődhet, még egy rövid kezelési periódus alatt is, ezért a leggyakoribb FKS mutációk gyors detektálására az FKS szekvenálás a legmegfelelőbb módszer (Didiuk és mtsai. 2015). A terápia hatékonyságában szerepet játszik a mutáció típusa is. Slater és munkatársai fungicid hatást értek el 20 mg/kg MICA-nal FKS1/fks1 heterozigóta *C. albicans* mutáns esetében, míg az fks1 homozigóta mutáns ellen egyik vizsgált dózis sem volt hatékony (Slater és mtsai. 2011). Mivel az FKS génben bekövetkező különböző mutációk nem azonos mértékű rezisztenciát eredményeznek, valamint egyéb, nem FKS-hez köthető mechanizmusok is előfordulhatnak, a MIC meghatározás RPMI-1640-ben vagy 50% szérummal kiegészített tápközegben még mindig alkalmazható a csökkent érzékenységet mutató izolátumok detektálására (Beyda és mtsai. 2014, Fernández-Silva és mtsai. 2014, Lepak és mtsai. 2012, Perlin 2014). Az echinocandin rezisztencia és a virulencia közötti kapcsolat pontosabb megértése az érzékeny és rezisztens izogén izolátumokkal elvégzett további kísérletekkel lehetséges.

Eredményeink megerősítik a klinikai tapasztalatokat, miszerint a nagyobb dózissal nem fokozható az echinocandinok hatékonysága az érzékeny *C. albicans* és *C. glabrata* klinikai izolátumokkal szemben (Betts és mtsai. 2009), csak a kezelési költség növekszik. Az *in vitro* mért adatok jól korreláltak az *in vivo* elért eredményekkel, az 50% humán szérumban kapott ölési ráták alapján a CAS *in vivo* hatékonysága előre megjósolható volt. A PG nem befolyásolja a CAS *in vivo* hatékonyságát. A nagyfokú rezisztenciával rendelkező *C. glabrata* izolátumok okozta invazív candidiasis nem kezelhető még nagy dózisú CAS-nal sem neutropeniás betegek esetében.

7. Összefoglalás

Az echinocandinokat kedvező farmakokinetikai és farmakodinámiás tulajdonságaiból adódóan széles körben alkalmazzák invazív candidiasis kezelésére, a mortalitási arány azonban még mindig magas (fajtól függően az 50-70%-ot is elérheti). Koncentrációfüggő aktivitása miatt a caspofungin dózis emelése terápiás előnyt jelenthet a *Candida* fertőzések esetén a jelenleg alkalmazott napi alacsony dózisokhoz képest.

Munkánk során meghatároztuk a caspofungin által kifejtett ölési rátát RPMI-1640-ben, valamint 50% humán szérummal kiegészített tápközegben *C. albicans* és *C. glabrata* klinikai izolátumok ellen. Továbbá neutropéniás egérmódelben vizsgáltuk a különböző napi caspofungin dózisok *in vivo* hatékonyságát a fentebb említett fajok esetében. Kísérleteinket bizonyítottan echinocandin rezisztens törzsekkel is elvégeztük.

A caspofungin ölési rátája (k) RPMI-1640 tápközegben nagyobb volt 1 mg/l-nél, mint a 16 és 32 mg/l koncentrációkon mért értékek az összes *C. albicans* izolátum esetében. Ugyanazon tápközegben a caspofungin fungicid aktivitással bírt 1 és 4 mg/l koncentrációkon már 7 órán belül három *C. glabrata* izolátumnál, viszont csak fungisztikus aktivitást tapasztaltunk a magas koncentrációkon (16 és 32 mg/l) (paradox növekedés). A caspofungin nagymértékben kötődik szérumfehérjékhez (96,5%), így a szérummal kiegészített tápközegben aktivitása csökkent, ellenben a korábban látott paradox növekedés megszűnt. A *C. albicans* klinikai izolátumok esetében 50% szérumban 1-32 mg/l (egy izolátumot kivéve), illetve a *C. glabrata* törzseknél 4-32 mg/l koncentrációkon koncentráció független ölést tapasztaltunk. A két fajnál a különböző koncentrációkhoz tartozó k értékek azonban széles tartományban mozogtak az izolátumok között (0,085-0,985 1/h; illetve 0,480-1,536 1/h). Neutropéniás egérmódelben a 3, 5 és 15 mg/kg napi caspofungin dózisok hatékonynak bizonyultak az összes *C. albicans* izolátum ellen, de a hatékony dózisok között szignifikáns különbség nem volt. A *C. glabrata* izolátumok esetén az összes dózis (1, 2, 3, 5 és 20 mg/kg/nap) statisztikailag szignifikáns módon csökkentette a vesékből kitenyésztett élő gombasejtek számát a kontrollhoz viszonyítva, a dózisok hatékonyságában szintén nem figyeltünk meg szignifikáns eltérést. Azonban az átlag szöveti csíraszám egyik esetben sem csökkent 10^5 CFU/g alá. Az érzékeny izolátumokkal összehasonlítva az echinocandin rezisztens *C. glabrata* törzsek virulensebbek voltak és esetükben egyik vizsgált dózis sem volt hatékony. *In vitro* és *in vivo* eredményeink alapján a dózis növelése nem fokozza a caspofungin aktivitását *C. albicans* és *C. glabrata* esetében, de a paradox növekedés nem befolyásolja a caspofungin *in vivo* hatékonyságát.

8. Summary

As echinocandins demonstrate favourable pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles they have been used widespread for the treatment of invasive candidiasis, but the mortality rate is still high (40-70% dependent on species). Due to its concentration dependent activity caspofungin dose escalation against *Candida* species could be more beneficial than currently used lower daily doses.

During our investigations killing rate exerted by caspofungin was determined in RPMI-1640 with and without 50% human serum against *C. albicans* and *C. glabrata* clinical isolates. Moreover the activity of different daily caspofungin doses were investigated in neutropenic mouse model in case of the previously mentioned species. We also performed experiments with caspofungin against echinocandin-resistant strains with known FKS mutations.

Caspofungin killing rate (k) in RPMI-1640 at 1 mg/l was higher than at 16 and 32 mg/l for all *C. albicans* isolates. In the same medium caspofungin at 1 and 4 mg/l showed fungicidal effect within 7 hours against three *C. glabrata* isolates but was only fungistatic at higher concentrations (16 and 32 mg/l) (paradoxically decreased killing activity). Caspofungin is highly protein-bound antifungal agent (96,5%), therefore it possess reduced activity in medium supplemented with serum. However adding 50% serum eliminated paradoxical growth. In the presence of 50% serum killing rates for *C. albicans* isolates were concentration independent between 1-32 mg/l (except one isolate). Similarly concentration independent killing was observed at 4-32 mg/l against *C. glabrata* isolates. Nevertheless k values showed a great variability among isolates (0,085-0,985 1/h; and 0,480-1,536 1/h). Daily 3, 5 and 15 mg/kg caspofungin was effective in a neutropenic murine model against all *C. albicans* isolates, without significant differences between the effective doses. All caspofungin doses (1, 2, 3, 5 and 20 mg/kg/day) decreased the fungal tissue burdens significantly in the case of *C. glabrata* isolates without statistical differences between doses, but the mean fungal tissue burdens never fell below 10^5 cells/g tissue. The echinocandin-resistant *C. glabrata* strains were highly virulent and all doses were ineffective. According to our *in vitro* and *in vivo* results caspofungin dose escalation does not improve efficacy against *C. albicans* and *C. glabrata* isolates. In addition paradoxical growth does not affect the *in vivo* efficacy of caspofungin.

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni elsősorban témavezetőmnek, Dr. Majoros Lászlónak, aki tanácsaival, útmutatásával segítette a szakmai fejlődésemet, továbbá munkámat minden körülmények között támogatta.

Köszönettel tartozom Dr. Kónya József intézetvezetőnek, hogy lehetővé tette számomra PhD tanulmányaim, valamint a kísérletes munka elvégzését az Orvosi Mikrobiológiai Intézetben.

Külön köszönetemet szeretném kifejezni az intézet korábbi és jelenlegi PhD hallgatóinak, Dr. Földi Richárdnak, Dr. Szilágyi Juditnak, Dr. Kovács Renátónak, Dr. Berényi Rékának, valamint Bozó Aliznak a kísérletek során nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért.

Köszönöm Dr. Gesztelyi Rudolfnak a statisztikai analízisben való segítségét.

Köszönet illeti Orosz-Tóth Katalint, aki az egerek intravénás oltásával járult hozzá a kísérletek sikeréhez, valamint Hartman Zsoltot a táptalajkonyhán végzett gyors és megbízható munkájáért.

Köszönettel tartozom David S. Perlin Professzor Úrnak, aki biztosította számukra a kísérleteinkben felhasznált echinocandin rezisztens izolátumokat.

Hálával tartozom az Orvosi Mikrobiológiai Intézet minden munkatársának, hogy áldozatos munkájukkal segítették a kutatásaimat.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom családomnak és Páromnak, akik mindvégig támogatták tanulmányaimat és motiválásukkal lehetővé tették a PhD értekezésem megírását.

10. Irodalomjegyzék

Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, Jiménez-Ortigosa C, Catania J, Booker R, Castanheira M, Messer SA, Perlin DS, Pfaller MA. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis*. 2013, 56(12):1724-32.

Andes D, Diekema D.J, Pfaller M.A, Bohrmuller J, Marchillo K, Lepak A. *In vivo* comparison of the pharmacodynamic targets for echinocandin drugs against *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010, 54:2497-2506.

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

Arendrup MC, Garcia-Effron G, Lass-Flörl C, Lopez AG, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Perlin DS. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species: comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, disk diffusion, and agar dilution methods with RPMI and isosensitest media. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010, 54(1):426-39.

Arendrup MC, Perlin DS, Jensen RH, Howard SJ, Goodwin J, Hope W. Differential *in vivo* activities of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against *Candida glabrata* isolates with and without FKS resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012, 56(5):2435-42.

Arendrup MC. *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. *Dan Med J*. 2013, 60(11):B4698.

Arendrup MC, Perlin DS. Echinocandin resistance: an emerging clinical problem? *Curr Opin Infect Dis*. 2014, 27(6):484-92.

Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Arzeni D, Giannini D, Scalise G. Comparison of the fungicidal activities of caspofungin and amphotericin B against *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005, 49(12):4989-92.

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

- 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.* 2014, 37(3):355-62.
- Betts RF**, Nucci M, Talwar D, Gareca M, Queiroz-Telles F, Bedimo RJ, Herbrecht R, Ruiz-Palacios G, Young JA, Baddley JW, Strohmaier KM, Tucker KA, Taylor AF, Kartsonis NA; Caspofungin High-Dose Study Group. A Multicenter, double-blind trial of a high-dose caspofungin treatment regimen versus a standard caspofungin treatment regimen for adult patients with invasive candidiasis. *Clin Infect Dis.* 2009, 48:1676-1684.
- Beyda ND**, Lewis RE, Garey KW. Echinocandin resistance in *Candida* species: mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches. *Ann Pharmacother.* 2012, 46(7-8):1086-96.
- Beyda ND**, John J, Kilic A, Alam MJ, Lasco TM, Garey KW. FKS mutant *Candida glabrata*: risk factors and outcomes in patients with candidemia. *Clin Infect Dis.* 2014, 59(6):819-25.
- Bizerra FC**, Melo AS, Katchburian E, Freymüller E, Straus AH, Takahashi HK, Colombo AL. Changes in cell wall synthesis and ultrastructure during paradoxical growth effect of caspofungin on four different *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011, 55(1):302-10.
- Bodey GP**, Mardani M, Hanna HA, Boktour M, Abbas J, Girgawy E, Hachem RY, Kontoyiannis DP, Raad II. The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. *Am J Med.* 2002, 112(5):380-5.
- Borghi E**, Andreoni S, Cirasola D, Ricucci V, Sciota R, Morace G. Antifungal resistance does not necessarily affect *Candida glabrata* fitness. *J Chemother.* 2014, 26(1):32-6.
- Brown JA**, Catley BJ. Monitoring polysaccharide synthesis in *Candida albicans*. *Carbohydr Res.* 1992, 227:195–202.
- Brunke S**, Hube B. Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. *Cell Microbiol.* 2013, 15(5):701-8.
- Cantón E**, Pemán J, Valentín A, Espinel-Ingroff A, Gobernado M. *In vitro* activities of echinocandins against *Candida krusei* determined by three methods: MIC and minimal fungicidal concentration measurements and time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009, 53(7):3108-11.

Cantón E, Pemán J, Hervás D, Espinel-Ingroff A. Examination of the *in vitro* fungicidal activity of echinocandins against *Candida lusitanae* by time-killing methods. *J Antimicrob Chemother.* 2013, 68(4):864-8.

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

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

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

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

Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Stein B, Hollick R, Lockhart SR, Magill SS, Derado G, Park BJ, Chiller TM. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. *Clin Infect Dis.* 2012, 55(10):1352-61.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 3rd ed. M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; 4th informational supplement. CLSI document M27-S4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.

Colombo AL, Guimarães T, Sukienik T, Pasqualotto AC, Andreotti R, Queiroz-Telles F, Nouér SA, Nucci M. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. *Intensive Care Med.* 2014, 40(10):1489-98.

Cornely OA, Vehreschild JJ, Vehreschild MJ, Würthwein G, Arenz D, Schwartz S, Heussel CP, Silling G, Mahne M, Franklin J, Harnischmacher U, Wilkens A, Farowski F, Karthaus M,

- Lehrnbecher T, Ullmann AJ, Hallek M, Groll AH. Phase II dose escalation study of caspofungin for invasive Aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011, 55(12):5798-803.
- Cota J**, Carden M, Graybill JR, Najvar LK, Burgess DS, Wiederhold NP. *In vitro* pharmacodynamics of anidulafungin and caspofungin against *Candida glabrata* isolates, including strains with decreased caspofungin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006, 50(11):3926-8.
- Cuéllar-Cruz M**, López-Romero E, Villagómez-Castro JC, Ruiz-Baca E. *Candida* species: new insights into biofilm formation. *Future Microbiol.* 2012, 7(6):755-71.
- Csank C**, Haynes K. *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol Lett.* 2000, 189(1):115-20.
- de Groot PW**, Kraneveld EA, Yin QY, Dekker HL, Gross U, Crielaard W, de Koster CG, Bader O, Klis FM, Weig M. The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins. *Eukaryot Cell.* 2008, 7(11):1951-64.
- Denning DW**. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet.* 2003, 362(9390):1142-51.
- Deresinski SC**, Stevens DA. Caspofungin. *Clin Infect Dis.* 2003, 36(11):1445-1457.
- De Rosa FG**, Garazzino S, Pasero D, Di Perri G, Ranieri VM. Invasive candidiasis and candidemia: new guidelines. *Minerva Anesthesiol.* 2009, 75(7-8):453-8.
- Delaloye J**, Calandra T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence.* 2014, 5(1):160-69.
- Dimopoulos G**, Karabinis A, Samonis G, Falagas ME. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007, 26(6):377-84.
- Douglas LJ**. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 2003, 11(1):30-6.
- Dudiuk C**, Gamarra S, Jimenez-Ortigosa C, Leonardelli F, Macedo D, Perlin DS, Garcia-Effron G. Quick Detection of FKS1 Mutations Responsible for Clinical Echinocandin Resistance in *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 2015, 53(7):2037-41.

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

Espinel-Ingroff A, Arendrup MC, Pfaller MA, Bonfietti LX, Bustamante B, Canton E, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Fothergill A, Fuller J, Gaustad P, Gonzalez GM, Guarro J, Lass-Flörl C, Lockhart SR, Meis JF, Moore CB, Ostrosky-Zeichner L, Pelaez T, Pukinskas SR, St-Germain G, Szeszs MW, Turnidge J. Interlaboratory variability of caspofungin MICs for *Candida* spp. using CLSI and EUCAST methods: should the clinical laboratory be testing this agent? *Antimicrob Agents Chemother.* 2013, 57: 5836-5842.

Farmakiotis D, Tarrand JJ, Kontoyiannis DP. Drug-resistant *Candida glabrata* infection in cancer patients. *Emerg Infect Dis.* 2014, 20(11):1833-40.

Farmakiotis D, Kyvernitakis A, Tarrand J.J, Kontoyiannis D.P. Early initiation of appropriate treatment is associated with increased survival in cancer patients with *Candida glabrata* fungaemia: a potential benefit from infectious disease consultation. *Clin Microbiol Infect.* 2015, 21(1):79-86.

Fernández-Silva F, Lackner M, Capilla J, Mayayo E, Sutton D, Castanheira M, Fothergill AW, Lass-Flörl C, Guarro J. *In vitro* antifungal susceptibility of *Candida glabrata* to caspofungin and the presence of FKS mutations correlate with treatment response in an immunocompromised murine model of invasive infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014, 58(7):3646-9.

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

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

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

- Garcia-Effron G**, Park S, Perlin DS. Correlating echinocandin MIC and kinetic inhibition of fks1 mutant glucan synthases for *Candida albicans*: implications for interpretive breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009/b, 53(1):112-22.
- Garcia-Effron G**, Park S, Perlin DS. Improved detection of *Candida* sp. fks hot spot mutants by using the method of the CLSI M27-A3 document with the addition of bovine serum albumin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011, 55(5):2245-55.
- Gauwerky K**, Borelli C, Korting HC. Targeting virulence: a new paradigm for antifungals. *Drug Discov Today.* 2009, 14(3-4):214-22.
- Gil-Alonso S**, Jauregizar N, Cantón E, Eraso E, Quindós G. *In vitro* fungicidal activities of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against *Candida glabrata*, *Candida braccarensis*, and *Candida nivariensis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015, 59(6):3615-8.
- Glöckner A**. Treatment and prophylaxis of invasive candidiasis with anidulafungin, caspofungin and micafungin: review of the literature. *Eur J Med Res.* 2011, 16(4):167-79.
- Gumbo T**. Impact of pharmacodynamics and pharmacokinetics on echinocandin dosing strategies. *Curr Opin Infect Dis.* 2007, 20(6):587-91.
- Hachem R**, Hanna H, Kontoyiannis D, Jiang Y, Raad I. The changing epidemiology of invasive candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. *Cancer.* 2008, 112(11):2493-9.
- Hasibeder W**, Halabi M. *Candida* peritonitis. *Minerva Anesthesiol.* 2014, 80(4):470-81.
- Horn DL**, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, Marr KA, Pfaller MA, Chang CH, Webster KM. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis.* 2009, 48(12):1695-703.
- Howard SJ**, Livermore J, Sharp A, Goodwin J, Gregson L, Alastruey-Izquierdo A, Perlin DS, Warn PA, Hope WW. Pharmacodynamics of echinocandins against *Candida glabrata*: requirement for dosage escalation to achieve maximal antifungal activity in neutropenic hosts. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011, 55(10):4880-7.
- Hurley R**, De Louvois J. *Candida* vaginitis. *Postgrad Med J.* 1979, 55(647):645-7.

Ito JI, Kriengkauykiat J, Dadwal SS, Arfons LM, Lazarus HM. Approaches to the early treatment of invasive fungal infection. *Leuk Lymphoma*. 2010, 51(9):1623-31.

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

Juárez-Cepeda J, Orta-Zavalza E, Cañas-Villamar I, Arreola-Gómez J, Pérez-Cornejo GP, Hernández-Carballo CY, Gutiérrez-Escobedo G, Castaño I, De Las Peñas A. The EPA2 adhesin encoding gene is responsive to oxidative stress in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Curr Genet*. 2015, 61(4):529-44.

Kauffman CA, Vazquez JA, Sobel JD, Gallis HA, McKinsey DS, Karchmer AW, Sugar AM, Sharkey PK, Wise GJ, Mangi R, Mosher A, Lee JY, Dismukes WE. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. The National Institute for Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. *Clin Infect Dis*. 2000, 30(1):14-8.

Kaur R, Ma B, Cormack BP. A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104(18):7628-33.

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

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

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*. 2014, 63(Pt 2):186-94.

Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002, 46(6):1773-80.

Lackner M, Tscherner M, Schaller M, Kuchler K, Mair C, Sartori B, Istel F, Arendrup MC, Lass-Flörl C. Positions and numbers of FKS mutations in *Candida albicans* selectively

influence *in vitro* and *in vivo* susceptibilities to echinocandin treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014, 58(7):3626-35.

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

Lepak A, Castanheira M, Diekema D, Pfaller M, Andes D. Optimizing Echinocandin dosing and susceptibility breakpoint determination via *in vivo* pharmacodynamic evaluation against *Candida glabrata* with and without fks mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012, 56(11):5875-82.

Lepak AJ, Andes DR. Antifungal pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014, 5(5):a019653.

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

Lewis JS 2nd, Wiederhold NP, Wickes BL, Patterson TF, Jorgensen JH. Rapid Emergence of Echinocandin Resistance in *Candida glabrata* Resulting in Clinical and Microbiologic Failure. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013, 57(9):4559-61.

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

Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Madec Y, Denoeud-Ndam L, Wolff M, Fontanet A, Bretagne S, Dromer F, French Mycosis Study Group. Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). *Intensive Care Med.* 2014, 40(9):1303-12.

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

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

MacCallum DM, Odds FC. Need for early antifungal treatment confirmed in experimental disseminated *Candida albicans* infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004, 48(12):4911-4.

- Majoros L**, Kardos G, Pócsi I, Szabó B. Distribution and susceptibility of *Candida* species isolated in the Medical University of Debrecen. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2002, 49:351-61.
- Marchetti O**, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Ruef C, Garbino J, Calandra T, Glauser MP, Täuber MG, Pittet D, Fungal Infection Network of Switzerland. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clin Infect Dis*. 2004, 38: 311-320.
- Mayer FL**, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013, 4(2):119-28.
- Méan M**, Marchetti O, Calandra T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Crit Care*. 2008, 12(1):204.
- Migoya EM**, Mistry GC, Stone JA, Comisar W, Sun P, Norcross A, Bi S, Winchell GA, Ghosh K, Uemera N, Deutsch PJ, Wagner JA. Safety and pharmacokinetics of higher doses of caspofungin in healthy adult participants. *J. Clin. Pharmacol*. 2011, 51:202-211.
- Naglik J**, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol*. 2004, 6(10):915-26.
- Nasar A**, Ryan L, Frei CR, Cota JM, Wiederhold NP. Influence of serum and albumin on echinocandin *in vitro* potency and pharmacodynamics. *Curr Fungal Infect Rep*. 2013, 7:89-95
- Nguyen MH**, Yu VL. Meningitis caused by *Candida* species: an emerging problem in neurosurgical patients. *Clin Infect Dis*. 1995, 21(2):323-7.
- Odabasi Z**, Paetznick V, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L. Effects of serum on *in vitro* susceptibility testing of echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007, 51(11):4214-6.
- Olson JA**, Adler-Moore JP, Smith PJ, Proffitt RT. Treatment of *Candida glabrata* infection in immunosuppressed mice by using a combination of liposomal amphotericin B with caspofungin or micafungin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005, 49(12):4895-902.
- Paderu P**, Garcia-Effron G, Balashov S, Delmas G, Park S, Perlin DS. Serum differentially alters the antifungal properties of echinocandin drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007, 51(6):2253-6.
- Pappas PG**, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, Kauffman CA, Hyslop N, Mangino JE, Chapman S, Horowitz HW, Edwards JE, Dismukes WE; NIAID Mycoses Study Group. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and

influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis*. 2003, 37(5):634-43.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD; Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009, 48(5):503-35.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, Zaoutis TE, Sobel JD. Executive Summary: Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016, 62(4):409-17.

Perlin DS. Echinocandin Resistance in *Candida*. *Clin Infect Dis*. 2015, 61 Suppl 6:S612-7.

Perlin DS. Echinocandin resistance, susceptibility testing and prophylaxis: implications for patient management. *Drugs*. 2014, 74(14):1573-85.

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

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

Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Int J Antimicrob Agents*. 2011/a, 38(1):65-9.

Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *J Clin Microbiol*. 2011/b, 49(1):396-9.

Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, Arendrup MC, Brown SD, Lockhart SR, Motyl M, Perlin DS; CLSI Subcommittee for Antifungal Testing. Clinical breakpoints for the echinocandins

and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist Updat.* 2011/c, 14(3):164-76.

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

Pongrácz J, Juhász E, Iván M, Kristóf K. Significance of yeasts in bloodstream infection: Epidemiology and predisposing factors of Candidaemia in adult patients at a university hospital (2010-2014). *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2015, 62(3):317-29.

Rueda C, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. Paradoxical growth of *Candida albicans* in the presence of caspofungin is associated with multiple cell wall rearrangements and decreased virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014, 58(2):1071-83.

Ruhnke M. Antifungal stewardship in invasive *Candida* infections. *Clin Microbiol Infect.* 2014, 20 Suppl 6:11-8.

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

Simitsopoulou M, Kyrpitzis D, Velegraki A, Walsh TJ, Roilides E. Caspofungin at catheter lock concentrations eradicates mature biofilms of *Candida lusitanae* and *Candida guilliermondii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014, 58(8):4953-6.

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

Sipsas NV, Lewis RE, Tarrand J, Hachem R, Rolston KV, Raad II, Kontoyiannis DP. Candidemia in patients with hematologic malignancies in the era of new antifungal agents (2001-2007): stable incidence but changing epidemiology of a still frequently lethal infection. *Cancer.* 2009, 115:4745-4752.

Sipsas NV, Kontoyiannis DP. Invasive fungal infections in patients with cancer in the Intensive Care Unit. *Int J Antimicrob Agents.* 2012, 39(6):464-71.

Slater JL, Howard SJ, Sharp A, Goodwin J, Gregson LM, Alastruey-Izquierdo A, Arendrup MC, Warn PA, Perlin DS, Hope WW. Disseminated Candidiasis caused by *Candida albicans*

with amino acid substitutions in Fks1 at position Ser645 cannot be successfully treated with micafungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011, 55(7):3075-83.

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

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

Sun JN, Solis NV, Phan QT, Bajwa JS, Kashleva H, Thompson A, Liu Y, Dongari-Bagtzoglou A, Edgerton M, Filler SG. Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLoS Pathog.* 2010, 6(11):e1001181.

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

Vanstraelen K, Lagrou K, Maertens J, Wauters J, Willems L, Spriet I. The Eagle-like effect of echinocandins: what's in a name? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013, 11(11):1179-91.

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

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

Wang E, Farmakiotis D, Yang D, McCue DA, Kantarjian HM, Kontoyiannis DP, Mathisen MS. The ever-evolving landscape of candidaemia in patients with acute leukaemia: non-susceptibility to caspofungin and multidrug resistance are associated with increased mortality. *J Antimicrob Chemother.* 2015, 70(8):2362-8.

Weiss E, Timsit JF. Management of invasive candidiasis in nonneutropenic ICU patients. *Ther Adv Infect Dis.* 2014, 2(5-6):105-15.

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

Wiederhold NP, Grabinski JL, Garcia-Effron G, Perlin DS, Lee SA. Pyrosequencing to detect mutations in FKS1 that confer reduced echinocandin susceptibility in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008, 52(11):4145-8.

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

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

Yang W, Yan L, Wu C, Zhao X, Tang J. Fungal invasion of epithelial cells. *Microbiol Res*. 2014, 169(11):803-10.

Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag*. 2014, 10:95-105.

11. Tárgyszavak-Keywords

echinocandinok, szérum alapú érzékenység meghatározás, idő-ölés kísérletek, ölési ráta, neutropéniás egérmodell, *Candida* fajok, humán szérum, paradox növekedés, dózisznövelés

echinocandins, serum-based susceptibility testing, time-kill experiments, killing rate, neutropenic murine model, *Candida* species, human serum, paradoxical growth, dose escalation



Nyilvántartási szám: DEENK/84/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Domán Marianna
Neptun kód: I441RU
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Domán, M.**, Kovács, R., Perlin, D.S., Kardos, G., Gesztelyi, R., Juhász, B., Bozó, A., Majoros, L.:
Dose escalation studies with caspofungin against *Candida glabrata*.
J. Med. Microbiol. 64 (9), 998-1007, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.000116>
IF:2.248 (2014)
2. **Domán, M.**, Kovács, R., Kardos, G., Gesztelyi, R., Juhász, B., Bozó, A., Kardos, T., Saleh, Q.,
Majoros, L.: Killing rates of caspofungin in 50 percent serum correlate with caspofungin
efficacy against *Candida albicans* in a neutropenic murine model.
Current Drug Del. 12, 1-10, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1567201812666150623091336>
IF:1.478 (2014)

További közlemények

3. Kovács, R., Bozó, A., Gesztelyi, R., **Domán, M.**, Kardos, G., Nagy, F., Tóth, Z., Majoros, L.: Effect
of caspofungin and micafungin in combination with farnesol against *Candida parapsilosis*
biofilms.
Int. J. Antimicrob. Agents. Epub ahead of print (2016)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.01.007>
IF:4.296 (2014)





4. 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. 178 (3-4), 197-206, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-014-9799-4>
IF:1.528
5. 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:2.248
6. 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:1.784

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 13,582

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 3,726

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

Debrecen, 2016.04.01.



12. Függelék

Poszterek

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

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

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

Renátó Kovács, Aliz Bozó, **Marianna Domán**, Fruzsina Nagy, Zoltán Tóth, László Majoros. Effect of caspofungin and micafungin in combination with farnesol against *Candida parapsilosis* biofilms. 7th Trends in Medical Mycology, 9-12 October 2015. Lisbon, Portugal (P073)

Konferencia előadások

Domán Marianna, Kovács Renátó, Berényi Réka, Kardos Gábor, Majoros László. A caspofungin *in vitro* és *in vivo* aktivitásának vizsgálata paradox növekedést mutató, illetve nem mutató *Candida albicans* izolátumok ellen. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése, 2014. október 15-17. Keszthely.

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, Gesztelyi Rudolf, Kardos Gábor, **Domán Marianna**, Berényi Réka, Majoros László. A caspofungin *in vitro* farmakodinámiájának összehasonlító vizsgálata szérummentes és 50% szérummal kiegészített tápközegben *Candida albicans* izolátumok ellen. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése, 2014. október 15-17. Keszthely.