

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

***A Candida* biofilmek klinikai jelentősége és alternatív
terápiás megközelítésük**

dr. Vitális Eszter

Témavezető: Dr. Kovács Renátó



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSJEJYZÉK	2
2. BEVEZETÉS	3
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
3.1. A KATÉTER-ASSZOCIÁLT FERTŐZÉSEK KLINIKAI HÁTTERE	5
3.2. CANDIDAEMIA	7
3.3. EGY ÚJ FELTÖREKVŐ <i>CANDIDA</i> FAJ A KLINIKUMBAN, A <i>CANDIDA AURIS</i>	11
3.4. SZISZTÉMÁSAN ALKALMAZHATÓ TRADICIONÁLIS ANTIFUNGÁLIS SZEREK	15
3.4.1. <i>Poliének</i>	16
3.4.2. <i>Triazolok</i>	18
3.4.3. <i>Echinocandinok</i>	20
3.5. A <i>CANDIDA</i> BIOFILMEK ÁLTALÁNOS JELLEMZŐI	21
3.6. A FARNESOL, MINT ÚJ POTENCIÁLIS TERÁPIÁS ALTERNATÍVA	26
4. CÉLKITŰZÉSEK	29
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	30
5.1. A BIOFILM KÉPZÉSI VIZSGÁLATRA HASZNÁLT IZOLÁTUMOK KIVÁLASZTÁSI KRITÉRIUMAI, DEFINÍCIÓK	30
5.1.1. <i>A Candida auris</i> izolátumok eredete	30
5.2. A CANDIDAEMIA-BÓL SZÁRMAZÓ KLINIKAI IZOLÁTUMOK BIOFILMKÉPZÉSÉNEK VIZSGÁLATA	31
5.3. A PLANKTONIKUS SEJTEK ÉRZÉKENYSÉGÉNEK VIZSGÁLATA	32
5.4. A BIOFILMEK ANTIFUNGÁLIS SZEREKKEL SZEMBENI ÉRZÉKENYSÉGE	33
5.5. A FARNESOL PLANKTONIKUS NÖVEKEDÉSRE GYAKOROLT HATÁSÁNAK A VIZSGÁLATA <i>CANDIDA AURIS</i> SEJTEK ESETÉBEN	33
5.6. A FARNESOL BIOFILMRE GYAKOROLT HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA <i>CANDIDA AURIS</i> SEJTEK ESETÉBEN	34
5.7. AZ AZOLOK, ILLETVE A FARNESOL KÖZÖTT FENNÁLLÓ <i>IN VITRO</i> KÖLCSÖNHATÁSOK VIZSGÁLATA	34
5.8. A FARNESOL HATÁSÁNAK <i>IN VIVO</i> VIZSGÁLATA NEUTROPÉNIÁS EGÉRMODELLBEN	35
6. EREDMÉNYEK	37
6.1. A BIOFILMKÉPZÉSI EPIDEMIOLÓGIAI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI	37
6.2. A FARNESOL HATÁSA A <i>CANDIDA ALBICANS</i> ÉS A <i>CANDIDA AURIS</i> PLANKTONIKUS SEJTEKRE	43
6.3. A FARNESOL HATÁSA A <i>CANDIDA ALBICANS</i> ÉS A <i>CANDIDA AURIS</i> BIOFILMKÉPZÉSÉRE, VALAMINT AZ 1-NAPOS BIOFILMEKRE	44
6.3.1. <i>A különböző farnesol-koncentrációk hatása a biofilmképző képességre</i>	44
6.3.2. <i>A biofilmképződést megelőzően 24 órán keresztül farnesollal (75 µM) előzetesen exponált sejtek biofilmképző képessége</i>	44
6.3.3. <i>A különböző farnesol-koncentrációk hatása az egynapos biofilmekkel szemben</i>	45
6.4. A PLANKTONIKUS ÉS SZESSZILIS <i>CANDIDA ALBICANS</i> ÉS <i>CANDIDA AURIS</i> SEJTEK ÉRZÉKENYSÉGI PROFILJA	46
6.5. A TRIAZOLOK ÉS A FARNESOL KÖZÖTTI INTERAKCIÓK TERMÉSZETE A <i>CANDIDA AURIS</i> ÉS <i>CANDIDA ALBICANS</i> BIOFILMEK ESETÉBEN	47
6.6. A FARNESOL HATÁSÁNAK <i>IN VIVO</i> VIZSGÁLATA <i>CANDIDA ALBICANS</i> ÉS <i>CANDIDA AURIS</i> ESETÉBEN	48
6.7. A TÁRSSZERZŐK KÖZREMŰKÖDÉSE AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK ELKÉSZÍTÉSÉBEN	50
7. MEGBESZÉLÉS	51
8. ÖSSZEFOGLALÁS	57
9. SUMMARY	58
10. IRODALOMJEGYZÉK	59
11. TÁRGYSZAVAK-KEYWORDS	81
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	82
13. FÜGGELÉK	83

1. Rövidítésjegyzék

ALS	Agglutinin-like Sequence
ATCC	American Type Culture Collection
CDC	Centers for Disease Control and Prevention – Amerikai Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ
CFU	Colony Forming Unit
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control - Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ
ECM	Extracelluláris Mátrix
EPS	Extracelluláris Poliszacharid
FICI	Fractional Inhibitory Concentration Index – gátló koncentráció-hányad index
FKS1, FKS2	a β -1,3-D-glükán-szintáz enzimkomplex két alegysége
IDSA	Infectious Diseases Society of America
ITS	Internal Transcribed Spacer
MIC	Minimal inhibitory concentration – minimális gátló koncentráció
MOPS	3-N-morfolino-propánszulfonsav
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute Medium – sejtenyésztésre alkalmas táptalaj
SAP	Szekretált aszpartil proteinázok
SDA	Sabouraud dextrose agar – gombák tenyésztésére alkalmas táptalaj
SNP	Single-nucleotide polymorphism – egy-nukleotid polimorfizmus
XTT	2,3-bisz-(2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazolium-5-karboxanilid

2. Bevezetés

Becslések szerint világszerte 2,2-3,8 millió gombafaj létezik, melyek közül körülbelül 300 képes emberi megbetegedést okozni (Hawksworth és mtsai. 2017). A *Candida* fajok az emberi gombafertőzések leggyakoribb kórokozói közé tartoznak. Évente körülbelül 400 000 *Candida* okozta véráramfertőzés fordul elő világszerte, amelyek halálozási aránya meghaladja a 40%-ot (Magell és mtsai. 2018). Az Amerikai Egyesült Államokban a *Candida* okozta véráramfertőzések éves előfordulási aránya 9,5-14,4 eset 100 000 lakosra vonatkoztatva. Európában ez az érték országtól függően általában 1,4 és 5,7/100 000 közötti (Magell és mtsai. 2018).

Az elmúlt két évtizedben a rezisztens gombafertőzések előfordulása folyamatosan nő a sokszor kontrolálatlan mezőgazdasági, állat- és humángyógyászati antifungális szer felhasználás miatt. Ráadásul a globális felmelegedés és az antropogén hatások következtében kevésbé ismert, potenciálisan multirezisztens gombafajok jelentek meg a klinikai gyakorlatban, mint például a *Candida auris*, az azolrezisztens *Aspergillus* fajok vagy a *Lomentospora prolificans*. Ezek az újonnan megjelenő kórokozók további kihívások elé állítják az orvostudományt (Wiederhold 2017, Kontoyiannis 2017).

Számos gombafaj képes a környezeti hatásoktól függően különböző morfológiai átalakulásra, mint például élesztőből hifa átalakulásra, ami sokszor biofilm képzéssel is párosulhat. A gombabiofilmek kulcsszerepet játszanak az adott faj virulenciájában, valamint a gombaellenes szerek ellen mutatott rezisztenciában. Sajnos jelenleg kevés olyan szer áll rendelkezésre, amelyek potens biofilm ellenes aktivitással rendelkeznek, ezért egyre inkább új típusú terápiákban, illetve alternatív antifungális megközelítésekben látják a gyakorló orvosok a megoldást (Silva és mtsai. 2017, De Barros és mtsai. 2020, Carvalheiro és Teixeira 2018). A legígéretesebb gombaellenes szerek már a fejlesztés 3. fázisában járnak. Ezek közül kiemelendő az ibrexafungerp, a rezafungin, a magas biohasznosulással rendelkező új típusú itraconazol, valamint a VT-1161-es kódszámon elérhető új típusú azol molekula (Davis és mtsai. 2019, Pfaller és mtsai. 2020, Niell és mtsai. 2019). A közelmúltban vizsgált alternatív terápiás megközelítések közé tartozik a rendelkezésre álló gombaellenes szerekkel végzett nagy dózisú terápia, antifungális lock terápia és a kombináció alapú terápiák (Seiler és Ostrosky-Zeichner 2021). Az *in vitro* és *in vivo* adatok alapján az echinocandinok és az amphotericin B a legígéretesebb kombináció-alapú terápiás stratégiák alapszerei, azonban további innovatív kezelési megközelítések lehetnek a quorum-sensing-et megzavaró terápiás megközelítések. A quorum-sensing molekulák szuprafiziológias koncentrációban alkalmazva megzavarják a

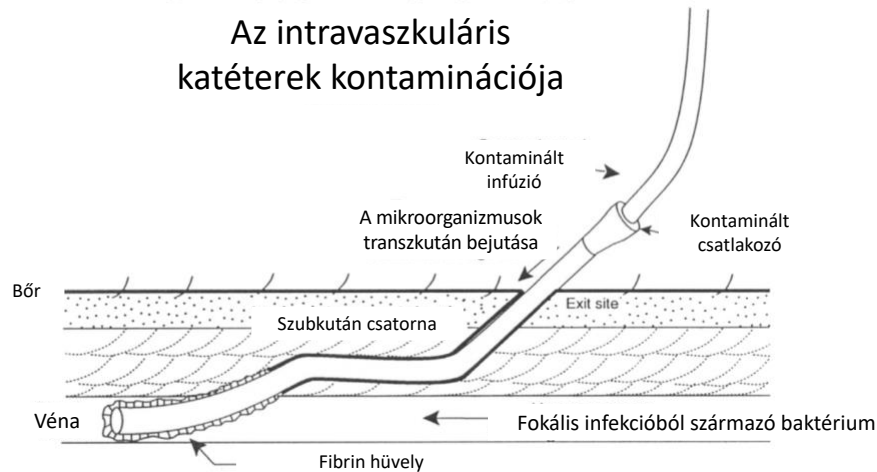
biofilmen belüli sejt-sejt kommunikációt, ami a biofilmek szilárd struktúrájának megbomlásához vezethet (Kovács és Majoros 2020). Reményeink szerint ezek az új innovatív kombinációs terápia hatékonyak lehetnek az újonnan megjelenő, csökkent érzékenységet mutató *Candida* fajokkal szemben, mint például a *C. auris*. A vizsgálataink eredményei jelentősen hozzájárulhatnak olyan új, alternatív terápiai stratégiák bevezetéséhez, amelyek segítségével hatékonyabban vehetjük fel a küzdelmet a jövő és a jelen multirezisztens gomba kórokozói ellen, különösen, ha a biofilm okozta védelmi vonalat is át kell törni.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A katéter-asszociált fertőzések klinikai háttere

Az intravaszkuláris katéterek - amelyek közé tartoznak például a perifériás és centrális vénás katéterek, különböző beültethető portok és az artériás katéterek - napjainkra már alapvető fontosságúak, és csaknem mindenütt jelen vannak az egészségügyben. Használatuk elengedhetetlen a betegek megfelelő kezeléséhez, ugyanakkor fertőzési kockázatot is jelentenek, bár a kanül-asszociált véráramfertőzések jelentős része a higiénés szabályok szigorú betartásával megelőzhető: egy 2008 és 2014 között elvégzett tanulmány alapján az Amerikai Egyesült Államok sürgősségi ellátást nyújtó kórházaiban 50%-kal csökkent a centrális vénás kanülokhöz társuló véráramfertőzések száma, ami tisztán mutatja, hogy a közelmúltban jelentős előrelépés történt az ilyen típusú infekciók prevenciója terén. Ennek ellenére a mai napig évente több tízezer betegnél fordul elő beültethető eszközhöz társuló véráramfertőzés, amelyek jelentős morbiditási és mortalitási terhet jelentenek, továbbá jelentősen megnövelik az adott beteghez tartozó kezelési költségeket (Rupp és Karnatak 2018, CDC 2016). Az Egyesült Államok sürgősségi ellátást nyújtó intézményeiben 1000 centrál vénás katéter beültetésre 2,9 katéter-asszociált fertőzés jut. Ugyanez a szám az intenzív osztályokon 1, míg az egyéb fekvőbeteg ellátó egységekben 0,7. A nagy európai kórházakban az esetek 3,7%-ban alakul ki véráramfertőzés, amelyek 43,6%-a társítható intravénás katéterekhez. Sajnos a kevésbé fejlett országokban 1000 centrál vénás katéter beültetésre 1,6-44,6 katéter-asszociált infekció is társulhat (Dudeck és mtsai. 2013, Rosenthal 2009, Zimlichman és mtsai. 2013).

Az 1-es ábra szemlélteti azokat az érkatéterhez társuló főbb útvonalakat, amelyeken keresztül egy katéter-asszociált infekció kialakulhat. Nagyon gyakran magának a betegnek a bőrfelülete szolgál a mikrobiális szennyeződés forrásaként. Ahogy a bőrön lévő mikrobák hozzáférnek a katéter felületéhez, kialakul a primer adhézió, aggregálódnak, felszaporodnak és különböző szesszilis közösségeket, úgynevezett biofilmeket alakítanak ki ezeken az abiotikus felszíneken. A biofilmek különböző növekedési és metabolikus jellemzőket mutató mikrobiális populációkat tartalmaznak, beleértve a metabolikusan inaktív dormáns szubpopulációkat, valamint a gyorsan osztódó sejtek csoportját. A fertőzött intravaszkuláris eszközökhöz társuló infekciók kezelése nagyon nehéz feladat, ezért sok esetben a legjobb megoldás a fertőzött/kolonizált eszköz eltávolítása; esetleg olyan alternatív terápiás megközelítések alkalmazása, mint az antimikrobiális lock terápia vagy speciális, a mikrobák megtapadását gátló anyaggal bevont kanülok és katéterek használata a szekunder prevenció során. (Rupp és Karnatak 2018).



1. ábra: A katéter-asszociált infekciók kialakulásának módjai (Rupp és Karnatak 2018)

A katéter-asszociált fertőzés egyértelmű azonosítása rendkívül fontos, hiszen az elhibázott diagnózis olyan súlyos következményekkel járhat, mint például a szükségtelen katétereltávolítás, megnövekedett kezelési költségek vagy éppen a megnövekedett mortalitás. Az Amerikai Fertőző Betegségek Társaságának (IDSA) klinikai gyakorlati útmutatója alapján katéter-asszociált véráramfertőzésről beszélünk, ha az alábbi kritériumok közül legalább egy teljesül (Mermel és mtsai. 2009):

- 1) a perkután nyert perifériás hemokultúrából és egy katétervég kvantitatív vagy szemikvantitatív tenyésztéséből ugyanazon mikroorganizmus tenyészik ki (Maki és mtsai. 2017);
- 2) a katéterlumenből és a perifériás vérből egyidejűleg vett hemokultúrák esetében legalább háromszoros különbség figyelhető meg az élő baktériumsejtek számában a katéterlumenből vett minta javára (Safdar és mtsai. 2005);
- 3) a katéterlumenből származó vér legalább 2 órával előbb válik pozitívvá a perifériás vérrel összehasonlítva (Raad és mtsai. 2004);
- 4) azokban az esetekben, amikor a perifériás vénából vett vér, vagy a katéter szegmensének tenyésztése nem végezhető el, a katéter-asszociált véráramfertőzés lehetséges diagnózisát a katéter 2 különböző lumenéből (kettős lumenű katéterek) nyert kvantitatív hemokultúra tenyésztés alapján lehet megállapítani, ahol pozitív esetben legalább háromszoros sejtszám-különbség figyelhető meg (Herrera-Guerra és mtsai. 2015).

Mivel a katéter-asszociált véráramfertőzés diagnózisa sokszor nem állítható fel vagy zárható ki egyértelműen, ha erős a gyanúnk, a katéter cseréje/eltávolítása javasolt, amennyiben nem áll

fenn ennek kontraindikációja. Ilyenkor a katétervég tenyésztése utólag megerősítheti a diagnózist, és a kolonizáló patogének ismerete segítheti az antibiotikum választást.

Katéter-asszociált véráramfertőzés (vagy annak gyanúja) esetén, a megfelelő tenyésztés elvégzése után empirikus antimikrobiális terápiát kell alkalmazni (Rupp és Karnatak 2018). Az empirikus terápia a következőktől függ: a legvalószínűbb kórokozó, katéter típusa, a gazdaszervezet jellemzői, a helyi antimikrobiális rezisztencia jellemzők, a beteg klinikai állapota/stabilitása és a szövődmények jelenléte. Az empirikusan adott terápiának le kell fednie a gram-pozitív baktériumokat. Erre elsősorban glikopeptid vagy daptomycin ajánlott az egészségügyi intézményekben jellemző meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* és koaguláz-negatív *Staphylococcus*-ok magas prevalenciája miatt (Rupp és Karnatak 2018). A gram-negatív baktériumok esetében az empirikus antibiotikumok kiválasztásának a helyi antimikrobiális érzékenységi mintázaton kell alapulnia. Általában anti-*pseudomonas* hatással is bíró negyedik generációs cefalosporin, béta-laktám/béta-laktamázgátló kombináció vagy karbapenem javasolt. *Candida*-kat is lefedő empirikus kezelés indokolt, amennyiben egy kritikus állapotú betegnél szeptikus sokk és többszervi elégtelenség áll fenn, és emellett legalább egy, nem-gasztrointesztinális minta (pl. vizelet, orr, torok, alsó vagy felső légúti minták, bőr hajlatok, drainek, műtéti terület) tenyésztése során *Candida* species tenyésztett ki. (Martin-Loeches és mtsai. 2019). Az echinocandinok a candidaemia empirikus terápiájában az elsőként választandó szerek, különösen, ha a *C. krusei* vagy *C. glabrata* fertőzések helyi prevalenciája magas, vagy ha a beteg az előző 3 hónapban azol-alapú gombaellenes terápiát kapott (Rupp és Karnatak 2018). Szintén echinocandint kell alkalmazni, amennyiben a candidaemia áll fenn, és a centrális vénás katéter eltávolítására vagy cseréjére nincs lehetőség a beteg állapota miatt.

3.2. Candidaemia

A candidaemia az invazív candidiasis leggyakoribb megjelenési formája, ami az összes invazív candidiasis körülbelül 75%-át teszi ki. A candidaemia-knak körülbelül a kétharmada kórházi osztályokon keletkezik. Azonban az otthoni ellátások/ápolások növekvő száma miatt egyre gyakrabban azonosítunk úgynevezett közösségben szerzett candidaemia-t (Diekema és mtsai. 2012; Wenzel és Gennings 2005). Több epidemiológiai adatot figyelembe véve a candidaemia-k 35-40%-a elsősorban az intenzív osztályokon fordul elő, míg nagyjából 1/3-uk tekinthető közösségi eredetűnek (Wenzel és Edmond 2001). Ha a véráramfertőzések teljes spektrumát nézzük, az ilyen típusú infekciók 8-10%-át okozzák a különböző *Candida* fajok, ugyanakkor

elmondható, hogy az 1980-as évek óta a *Candida* fajok a negyedik leggyakoribb okai a véráramfertőzéseknek a koaguláz negatív *Staphylococcus*-ok, a *S. aureus* és az *Enterococcus*-ok után (Quindos 2014, Tortorano és mtsai. 2006).

Az epidemiológiai tanulmányok többsége 1990-ig az invazív candidiasisok, illetve a candidaemia-k folyamatos növekedéséről számolt be. Jelenleg stagnáló incidenciadatok láthatunk a fejlett országokban. Földrajzi régiótól, országtól függően 100 000 lakosra vetítve átlagosan 8-10 esetet lehet azonosítani évente (Diekema és mtsai. 2012). Latin-Amerikában és a világ fejletlenebb régióiban azonban továbbra is folyamatosan növekszik az invazív candidiasisok és a candidaemia-k prevalenciája/incidenciája. Az Egyesült Államokban végzett népességalapú vizsgálatokban 100 000 lakosra vetítve 6-10 esetről számoltak be (Diekema és mtsai. 2012, Diekema és mtsai. 2002). Ezzel szemben a legtöbb európai felmérés 1,4-5,7-es előfordulási gyakoriságot mutat (100 000 lakosra számolva) (Almirante és mtsai. 2005, Asmundsdottir és mtsai. 2013). Érdeemes megjegyezni, hogy van két európai ország – Dánia és Spanyolország - ahol a candidaemia előfordulása magasabb, mint más európai országokban. Dánia esetében 8,3/100 000, míg Spanyolországban 8,8/100 000 az arány (Risum és mtsai. 2021, Piqueras és mtsai. 2020). Ausztráliában (1,8/100 000) és Kanadában (2,9/100 000) az arány hasonló az európai átlaghoz (Keighly és mtsai 2019, Carvalho és mtsai. 2014). A közelmúltban 8 latin-amerikai ország 22 egészségügyi centrumában végzett prospektív felmérés alapján 1000 kórházi felvételre 0,98 candidaemia-s epizód jut. A magasabb arányok hátterében olyan magyarázat állhat, mint az eltérő mintavételi arány, a predisponáló faktorok különbözősége, az életkori megoszlás vagy az eltérő vizsgálati módszerek (Diekema és mtsai. 2012).

A rosszindulatú tumoros elváltozások gyakori alapbetegségnek számítanak a candidaemia-s betegeknek, de ezen betegek között jelentős különbségek vannak. A hematológiai malignus betegségben szenvedőknél a kemoterápia és az ebből következő neutropénia, az emésztőrendszeri mucositis és a kortikoszteroidokkal való kezelés az invazív candidiasis legfontosabb kockázati tényezői. Ehhez képest a szolid tumoros betegeknek a candidaemia predisponáló tényezői az invazív műtétek, az intenzív osztályra való felvétel, a gépi lélegeztetés, és a centrális vénás katéterek használata (Almirenta és mtsai. 2006, Hajjeh és mtsai. 2004). Bár továbbra is tartja magát az a dogma, hogy a candidaemia-s esetek döntő többsége az intenzív osztályokról származik, egy nemrégiben elvégzett 1752 *Candida* izolátumot vizsgált SENTRY tanulmány alapján a candidaemia-s epizódok közel egyenlő arányban oszlanak meg az intenzív és a nem intenzív osztályok között (Pfaller és mtsai. 2011).

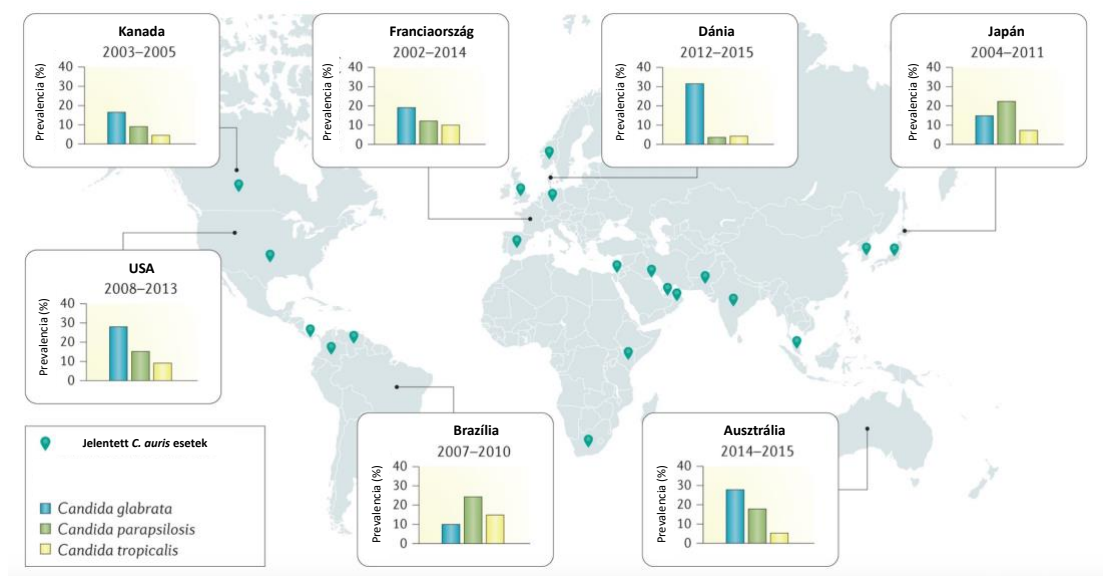
A candidaemia-ből azonosítható fajok földrajzi eloszlása és prevalenciája változó, azonban az továbbra is elmondható, hogy a *C. albicans* abszolút domináns fajként van jelen továbbra is (Pfaller és mtsai. 2011). A 2008-2009-es SENTRY vizsgálat alapján, a 79 egészségügyi központból származó *Candida* izolátumok körülbelül 90-95%-a csupán öt fajhoz tartozott: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* és *C. krusei* (Pfaller és mtsai. 2011). A candidaemia-t okozó *C. albicans* és non-*albicans Candida* fajok megoszlása kórházanként és betegcsoportonként eltérő lehet. A non-*albicans* fajok érdekes jellemzői a sajátos földrajzi eloszlás, a csökkent érzékenység a leggyakrabban használt antifungális szerekkel szemben, és az, hogy egy-egy species sokszor összefüggést mutat egy-egy betegcsoporttal. A becslések alapján a candidaemia-nak tulajdonítható halálozási arány > 30%, míg a nyers halálozási ráta több mint 50%. Ez a mortalitás messze meghaladja a legtöbb bakteriális fertőzés esetében jelentett értéket (Pfaller és mtsai. 2011).

A non-*albicans* candidaemia-k vonatkozásában a kimenetel elsősorban a *C. glabrata* és a *C. tropicalis* okozta véráramfertőzések esetén tűnik a legrosszabbnak. A *C. parapsilosis* okozta fertőzésekhez alacsonyabb mortalitás társul (23%) (Kim és mtsai. 2021). A *C. parapsilosis* főleg exogén forrásból származik és elsősorban malignus tumoros elváltozásban szenvedő betegekből, és fiatal felnőttekből izolálják, továbbá szignifikánsan magasabb prevalenciát mutat az újszülött intenzív osztályokon, ahol általában a centrális vénás katéterek kolonizációjával és a parenterális táplálással hozható összefüggésbe. Ez a faj főleg Latin-Amerikában, illetve az európai mediterrániumban okoz magasabb prevalenciával infekciókat. A *C. glabrata* és a *C. krusei* szempontjából rizikó faktorok a nagyobb hasi műtétek, a szolid tumorok, az idős kor (>65 év), a szervtranszplantáció és a kortikoszteroid kezelés. (Kim és mtsai. 2021, Demirci-Duarte és mtsai. 2021).

A candidaemia-s eseteknél a *C. glabrata* a második leggyakrabban azonosítható *Candida* faj az USA-ban, valamint Észak- és Közép-Európa országaiban (Pfaller és mtsai. 2011). A *C. glabrata* aránya világszerte nagyjából állandónak mondható (9-12%) de az USA-ban jóval gyakrabban (21,1%) izolálható faj, mint a világ többi részén (7,6-12,6%). Érdekesség, hogy a *C. glabrata* és a *C. krusei* okozta candidaemia-k aránya viszonylag alacsony Latin-Amerikában, ráadásul itt a *C. glabrata* klinikai izolátumok fluconazol iránti rezisztencia aránya is alacsonyabb (10-13%), mint az USA-ban (18-20%) (Pfaller és mtsai. 2011). A *C. tropicalis* elsősorban az idősebb korosztály (> 70 éves) betegeiből kerül azonosításra. Jelenlétük összefügghet a szolid tumorok és a hematológiai malignitások nagyobb gyakoriságával ebben a populációban (2. ábra) (Pfaller és mtsai. 2011, Risum és mtsai. 2021).

A korábban említett fajok közül kettő, a *C. parapsilosis* és a *C. glabrata* valójában speciális klinikai és demográfiai jellemzőkkel rendelkező fajkomplexumok. A *C. parapsilosis* 3 különböző fajt foglal magában: A *C. parapsilosis* sensu stricto, a *C. metapsilosis* és a *C. orthopsilosis*, de a *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* valódi jelentősége tényleges humán patogénként továbbra is kérdéses. Egy nemrégiben végzett spanyolországi vizsgálatban a *C. parapsilosis* és a *C. orthopsilosis* okozta candidaemia epizódok előfordulási gyakorisága 1000 beteg felvételenként 0,22 illetve 0,02 volt. Azonban érdemes kiemelni, hogy a *C. orthopsilosis* volt az ötödik leggyakrabban izolált faj, megelőzve a *C. krusei*-t (0,018 epizód 1000 felvételenként). A *C. orthopsilosis* magasabb prevalenciáját írták le a meleg és nedves éghajlatú országokból is, mint például Tajvan (8,5%), Brazília (9,1%) és Malajzia (24,4%) (2. ábra) (Lovero és mtsai. 2016).

A *C. glabrata* komplex a *C. glabrata* sensu stricto és két újonnan leírt faj, a *C. bracarensis* és a *C. nivariensis*. Lockhart és mtsai. 29 országból származó 1598 *C. glabrata* izolátum elemzésében megfigyelték, hogy a *C. bracarensis* és a *C. nivariensis* izolátumok a *C. glabrata* klinikai izolátumainak nagyon kis százalékát (0,2%) teszik ki. A legtöbb epidemiológiai tanulmány kiemelte a *C. bracarensis* és a *C. nivariensis* alacsonyabb érzékenységét a leggyakrabban használt azokkal szemben (Mirhendi és mtsai 2011).



2. ábra: A leggyakoribb non-*albicans* fajok földrajzi eloszlása (Pappas és mtsai. 2018)

A candidaemia-k menedzselése komplex feladat, jelentős kihívás a klinikusok számára: a megfelelő antifungális szer (elsősorban echinocandin) adásán kívül metasztatikus infekciók

(endocarditis, ophthalmitis, tályogok stb.) keresését, a biofilm-képzés predilekciós helyeként szolgáló centrális vénás katéterek eltávolítását vagy cseréjét és follow-up hemokultúrák vételét is magába foglalja, ráadásul önmagában az antifungális szer adástól nem minden esetben remélhető gyógyulás. A terápiát hosszasan kell folytatni (az első negatív hemokultúrától számított legalább 14 napig), hogy biztosan eradikálni tudjuk a biofilmekben megbúvó *Candida*-kat is, így elejét vegyük a relapsusnak és a távoli szövődményeknek. (Cornely és mtsai. 2012).

3.3. Egy új, jelentős veszélyt hordozó *Candida* faj a klinikumban, a *Candida auris*

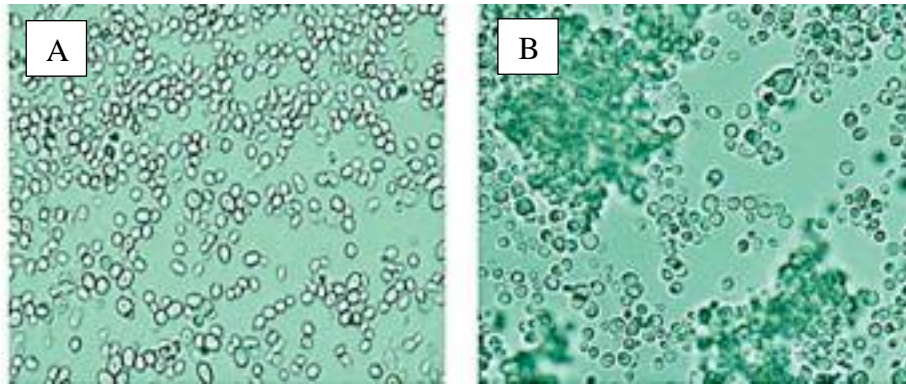
A *C. auris*-t először egy japán beteg hallójáratából izolálták 2009-ben (Satoh és mtsai. 2009). Egy retrospektív vizsgálat kimutatta, hogy a *C. auris* legkorábbi izolátuma 1996-ból származik, azonban ezt Dél-Koreában kezdetben tévesen *C. haemulonii*-ként azonosították (Oh és mtsai. 2011). A *C. auris* fertőzések 2009 előtt ritkák voltak, ami arra utal, hogy ez a gomba egy újonnan kifejlődött/hirtelen megjelent kórokozó (Satoh és mtsai. 2009). A 28S D1/D2 és 18S ITS régiók rDNS-szekvenciáinak elemzése alapján a *C. auris* a *Candida/Clavispora* kládon belül a *Saccharomycetales* rend *Metschnikowiaceae* családjának *C. haemulonii* kládjába tartozik. A *Metschnikowiaceae* család rokon fajait kimutatták növényekben, rovarokban és vízi környezetben egyaránt. A *C. auris* legközelebbi ismert rokona a *C. haemulonii*, amelyet először 1962-ben azonosítottak a *Haemulon sciurus* bélrendszeréből (Munoz és mtsai. 2018, Chatterjee és mtsai. 2015, Santos és mtsai. 2011).

A *C. auris* a szokásos fenotípusos és biokémiai módszerekkel *C. haemulonii*-ként félreidentifikálható. A CHROMagar táptalajon 42 °C-ig terjedő hőmérsékleten fehér, rózsaszín vagy sötétlila kolóniákat eredményez. Más *Candida* fajokkal ellentétben jól növekszik 42 °C-on, ezért ez a termotolerancia jól használható a többi *Candida* fajtól történő elkülönítés során. A *C. auris* termotoleranciája vezetett Casadevall és mtsai. (2019) azon feltételezéséhez, hogy megjelenése összefügghet az éghajlatváltozással és a globális hőmérsékletváltozással. A szerzők feltételezése szerint a *C. auris* környezeti gomba volt, amely korábban növényi szaprofitaként elsősorban vizes élőhelyeken fordul(t) elő (Jeffery-Smith és mtsai. 2018, Lee és mtsai. 2011). Egy 2021-ben megjelent tanulmányban először írták le a *C. auris*-t környezeti mintákból. Ezt megelőzően kizárólag kórházi környezetben sikerült azonosítani. Figyelemre méltó, hogy a *C. auris*-t két különböző élőhelyről, az indiai Andaman-szigetek sós mocsári vizes élőhelyéről és homokos tengerpartjáról is sikerült izolálni (Arora és mtsai. 2021).

Az Amerikai Járványügyi Központ (CDC) és az Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ (ECDC) 2016-ban számos figyelmeztetést adott ki, hogy tájékoztassa az egészségügyi szervezeteket a *C. auris*-ről, mint új, komoly veszélyt jelentő fertőző ágensről (Lockhart és mtsai. 2017). Lockhart és kollégái 2017-ben publikálták azt a mérföldkőnek számító tanulmányt, amelyben 3 különböző kontinensen szinte egyidejűleg felbukkanó *C. auris* törzsek különböző populációinak genomikai és epidemiológiai elemzéséről számoltak be (Lockhart és mtsai. 2017). A *C. auris* izolátumok azóta világszerte a mai napig legalább 50 országban jelentek meg. A *C. auris*-nak négy nagy, egymástól genetikailag jól elkülönülő kládja van: a dél-ázsiai klád (I), a kelet-ázsiai klád (II), a dél-afrikai klád (III) és a dél-amerikai klád (IV). A kládokon belül jellemzően kevesebb, mint 70 egynukleotid-polimorfizmus (SNP) különbség van, az egyes kládok között azonban több tízezernyi. Nemrégiben egy új *C. auris* kládot (V. klád) jelentettek Iránból; érdekes módon ezt a kládot több mint 200 000 SNP választja el a többi kládtól (Lockhart és mtsai. 2017).

A *C. auris*-t 2009 óta többször izolálták már a fertőzött egyének vizeletéből, epéjéből, véréből, sebekből, az orrból, a hónaljából, a bőrről és a végbélből. A *C. albicans*-szal ellentétben, amely a legtöbb egészséges egyén gyomor-bélrendszeri és húgyúti traktusát képes kolonizálni, a *C. auris* feltételezhetően elsősorban a bőrt kolonizálja. A klinikai megnyilvánulásai és az *in vivo* kísérletek együttesen arra utalnak, hogy a *C. auris* képtelen kolonizálni az anaerob környezetet, mint például a béltraktust (Jeffery-Smith és mtsai. 2018, Hata és mtsai. 2020, Day és mtsai. 2018, Pathirana és mtsai. 2017).

Más patogén *Candida* fajokhoz hasonlóan a *C. auris* is több morfológiai fenotípussal rendelkezik, bár az egyes morfológiák szabályozási mechanizmusai és azok szerepe nagyrészt ismeretlenek. A *C. auris* számos izolátuma egysejtű élesztő formában létezik. Az izolátumok egy része azonban képes nagy pszeudohifa-szerű sejtekből álló aggregátumokat képezni, ahol az anya és a leánysejtek egymáshoz kapcsolódva maradnak (3. ábra). Ezek az aggregátumok általában jobban tolerálják a gombaellenes szereket, mint nem aggregáló társaik; azonban az aggregáló sejtek a *Galleria mellonella* fertőzési modellben csökkent virulenciát mutatnak a nem aggregáló sejtekhez képest (Borman és mtsai. 2016, Singh és mtsai. 2019).



3. ábra: A *Candida auris* nem-aggregatív (A) és aggregatív (B) fenotípusa (Fotó: Public Health England Mycology Reference Laboratory)

Bizonyos környezeti tényezők (szérum, N-acetil-glükózamin, magas CO₂ szint) fonalas növekedést indukálnak a *C. albicans* esetében. Azonban ezek a tényezők nem váltanak ki hifaképződést a *C. auris*-ban. Egy nemrégiben végzett vizsgálatban a *C. auris*-t 10% NaCl-lal kiegészített YPD táptalajon tenyésztették. Ez a feltétel 37 °C és 42 °C hőmérsékleten is hosszúkás és pszeudohifa jellegű sejtek képződését idézte elő. Egy másik tanulmány nemrégiben arról számolt be, hogy a *C. auris* sejtek Hsp90 inhibitorral történő kezelése pszeudohifa szerű sejtek kialakulását eredményezte (Wang és mtsai. 2018, Welsh és mtsai 2017). A Hsp90 hasonló gátlása a *C. albicans*-ban is fonalas növekedést eredményezett, ami arra utal, hogy a filamentáció bizonyos szabályozási mechanizmusai legalább részben konzerválódtak a *C. albicans* és a *C. auris* esetében. A *C. auris* törzsek biofilmképző képessége erősen izolátum- és kládfüggő. Bár mind az aggregált, mind a nem-aggregált *C. auris* sejtípusok képesek biofilmek kialakítására, az utóbbiakról kimutatták, hogy robusztusabb szesszilis közösségeket tudnak létrehozni. Bár a *C. auris* biofilmek szerepe kevésbé ismert, mint a más *Candida* fajok által képzett biofilmeké, a *C. auris* szesszilis közösségek is minden bizonnyal hozzájárulnak a faj virulenciájához, rezisztenciájához és túlélési tulajdonságaihoz a környezetben és a gazdaszervezetben (Casadevall és mtsai. 2019, Kean és mtsai. 2018).

A virulenciával foglalkozó tanulmányok kimutatták, hogy a *C. albicans*-hoz hasonlóan a *C. auris* is számos ismert virulenciafaktort expresszál a gazdaszövetek lebontása és inváziója érdekében (Wang és mtsai. 2018, Yue és mtsai. 2018). Ilyenek például a szekretált aszpartil proteinázok és lipázok. *In vivo* modelleken végzett összehasonlító vizsgálatok azt mutatják, hogy mind az egér disszeminált fertőzési modellben, mind pedig a *G. mellonella* modellben a *C. auris* kevésbé virulens, mint a *C. albicans* (Borman és mtsai. 2016, Wang és mtsai. 2018). Azonban szignifikánsan virulensebb, mint a *C. glabrata* és a *C. haemulonii* (Yue és mtsai. 2018). A *C. albicans*-hoz képesti virulencia csökkenés valószínűleg annak köszönhető, hogy a *C. auris* a *C. glabrata*-hoz és a *C. haemulonii*-hoz hasonlóan nem képes az emlős

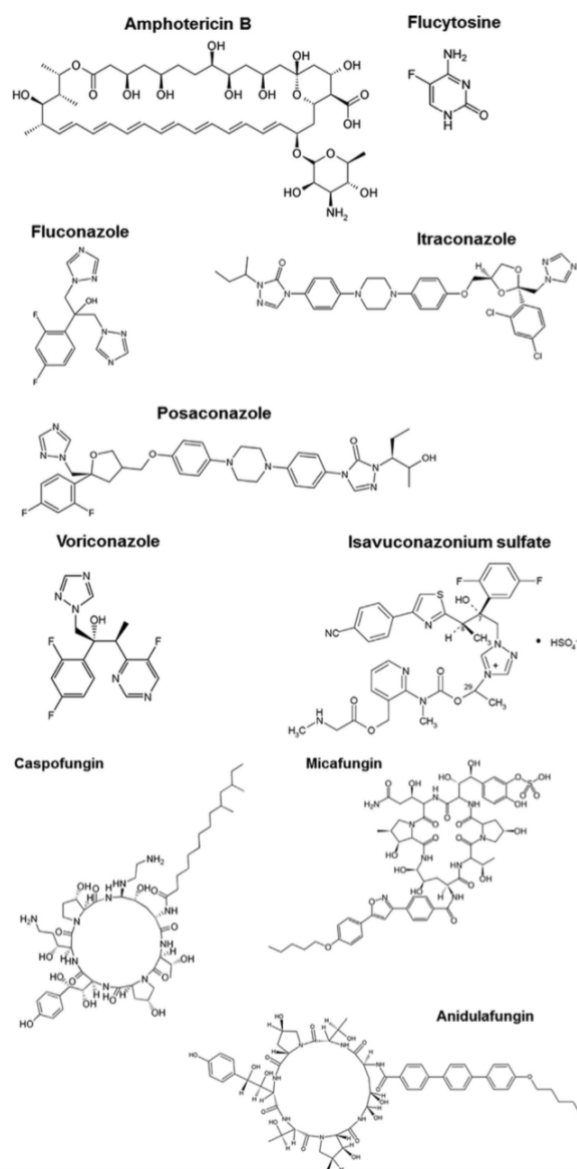
gazdaszervezetben hifákat vagy pszeudohifákat fejleszteni, amelyek kritikus szerepet játszanak a szöveti invázióban a fertőzések során (Yue és mtsai. 2018). A másik lehetséges magyarázat a genetikában keresendő, ugyanis a *C. auris* haploid genommal rendelkezik hasonlóan a *C. glabrata*-hoz (Hickman és mtsai. 2013). A *C. auris* egyes izolátumai mind *in vitro*, mind pedig *in vivo* körülmények között is képesek aggregátumokat képezni. A sejtaggregáció előnyös a *C. auris* számára, mivel lehetővé teszi a gombasejteknek, hogy elkerüljék a gazdaszervezet immunrendszerét, fennmaradjanak a gazdaszövetekben, és fokozottan ellenálljanak gombaellenes szereknek. A *C. albicans* sejtekkel összehasonlítva a neutrofil granulocyták kevésbé hatékonyak a *C. auris* sejtek elpusztításában. A gombasejtek aggregátumképző képessége valószínűleg akadályozza a gazdaszervezet veleszületett immunválaszát azáltal, hogy a *C. auris* számára fizikai védőgátat képez a környezettel szemben (Fakhim és mtsai. 2018).

Az egyik oka annak, hogy a *C. auris*-t "komoly fenyegető veszélynek" tekintik, az egyre inkább terjedő rezisztens/multirezisztens/pánrezisztens izolátumok előfordulása, a másik, hogy ez az egyetlen olyan *Candida* faj, amely nozokomiális járványokat képes okozni (Spivak és mtsai. 2018, Hata és mtsai. 2020). A *C. albicans* és más *Candida* fajok esetében használatos breakpoint-ok alapján a *C. auris* legtöbb izolátuma rezisztens a fluconazolra. A *C. auris* izolátumok egy része az amphotericin B és az echinocandin gyógyszerek esetében is magasabb minimális gátló koncentrációval (MIC) rendelkezik, és már vannak olyan klinikai izolátumok, amelyek minden rendelkezésre álló gombaellenes készítménnyel szemben rezisztensek (Lockhart és mtsai. 2017, Chowdhary és mtsai. 2014). Figyelemre méltó, hogy a *C. auris*-szal közeli rokon fajok, a *C. haemulonii* és a *C. lusitaniae* szintén gyakran rezisztensek egy vagy több gombaellenes gyógyszer-csoportra. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a *C. auris*, a *C. haemulonii* és a *C. lusitaniae* rezisztencia mechanizmusai hasonló genetikai utak által szabályozottak (Arendrup és mtsai. 2017). Az ERG11 gén által kódolt lanosterol-demetiláz enzim kulcsfontosságú a gombák, így a *C. auris* ergosterol szintézisében is. A génben bekövetkező mutáció fluconazol rezisztens fenotípust jelenthet az adott gombafajnál. Az Erg11-ben ismert 3 hot spot mutáció (Y132F, K143R és F126L vagy VF125AL), amelyek a különböző *C. auris* genetikai kládok fluconazol rezisztenciáját okozzák. Bár a fluconazolra és az amphotericin B-re rezisztens *C. auris* izolátumok gyakoriak, az echinocandin-rezisztens izolátumok még egyelőre viszonylag ritkák. Az FKS1 gén az 1,3-béta-D-glükán-szintáz katalitikus alegységét kódolja, amely a *Candida* fajok sejtfalszintézisében kritikus szerepet játszik. Az Fks1 S639F mutációjával rendelkező *C. auris* izolátumok jellemzően caspofungin

rezisztensek voltak, míg más, vad típusú Fks1-et hordozó izolátumok humán terápiás dózisban is érzékenyek maradtak erre az echinocandinra (Lockhart és mtsai. 2017).

3.4. Szisztémásan alkalmazható tradicionális antifungális szerek

Az elmúlt évszázadban a hatékony, jól tolerálható gombaellenes szerek kifejlesztése, bevezetése jelentősen elmaradt az antibakteriális terápia fejlődésétől. Az első komolyabb mérföldkövet az 1950-es években kifejlesztett amphotericin B deoxikolát jelentette, ami sok éven keresztül maradt az antifungális terápia sarokköve (Nett és Andes 2015). Az 1970-es években bevezettek egy pirimidin-analógot, a flucitozint, amelynek a használatát jelentősen korlátozza rezisztencia gyors kialakulása, amennyiben monoterápiában alkalmazzák. Az 1990-es évek közepén új, lipid alapú amphotericin B-formulákat hoztak forgalomba (Nett és Andes 2015). A kezdeti deoxikolát formulához képest ezek jobb mellékhatásprofilal és csökkent nefrotoxicitással rendelkeztek. A lipid-asszociált amphotericin B formulák megjelenése mellett az 1990-es évek másik jelentős előrelépése a triazolok bevezetése volt. Az amphotericin B készítményekkel összehasonlítva a triazolok sokkal jobban tolerálhatóak (Nett és Andes 2015). Az első generációs azol készítmények (fluconazol-1990, itraconazol-1992) elsősorban a *Candida* fajok ellen hatékonyak, míg a második generációs azolkészítmények (voriconazol-2002, posaconazol-2006) a *Candida* nemzetség mellett a fonalas gombák ellen is mutatnak aktivitást (Nett és Andes 2015). A 2015-ben megjelent legújabb azol (isavuconazol) hasonlóan széles spektrumú aktivitással rendelkezik, kedvezőbb farmakológiai tulajdonságokkal, ami jobb biohasznosulást, kiszámíthatóbb hatóanyagszinteket és kevesebb gyógyszerinterakciót eredményez. (Nett és Andes 2015). A gombaellenes készítmények legújabb csoportját az echinocandinok jelentik (caspofungin-2001, micafungin-2006, anidulafungin-2008). Ezek a szerek jelentős aktivitást mutatnak a *Candida* fajok ellen, továbbá sztatikus hatás figyelhető meg az *Aspergillus* fajokkal szemben is (4. ábra) (Nett és Andes 2015).

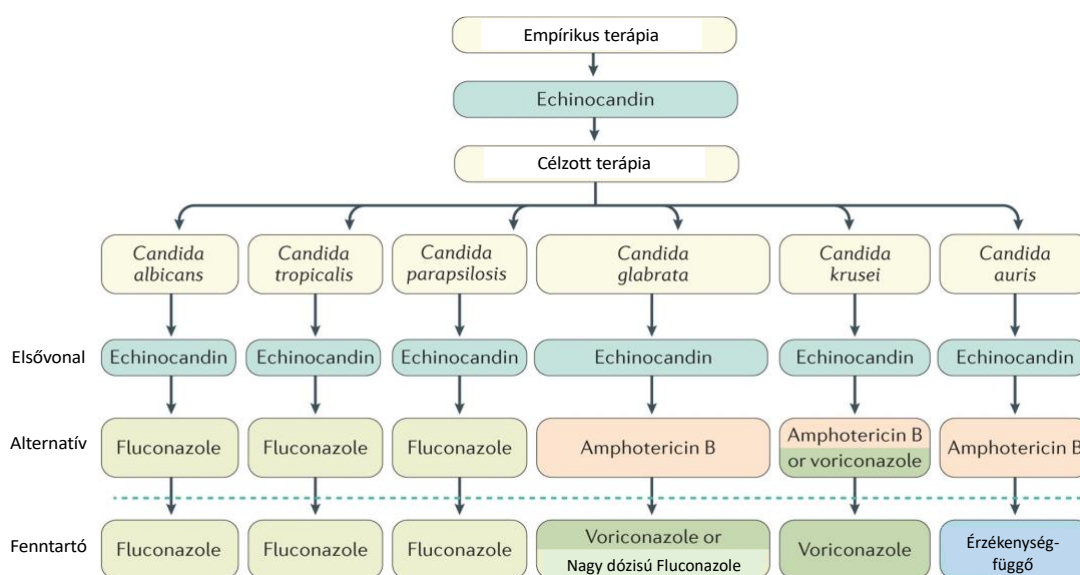


4. ábra: Az invazív gombafertőzések terápiájában használatos szisztémás antifungális szerek (Nett és Andes 2015)

3.4.1. Poliének

A poliének a *Streptomyces* fajok fermentlevéből izolált anyagcseretermékek. A szisztémás gombás fertőzések kezelésére az amphotericin B áll rendelkezésre (Gallis és mtsai. 1990). Kezdetben a deoxikolát formulát fejlesztették ki, majd 3 lipid alapú formulát vezettek be a klinikai gyakorlatba a toxicitás csökkentése és a tolerálhatóság javítása érdekében (Arikan és Rex 2001). Az amphotericin B a sejtmembrán ergosterollal való kölcsönhatásán keresztül fejti ki aktivitását, amely kapcsolat eredményeként pórusokat képez a gombasejtek felszínén. A pórusok kialakulása lehetővé teszi az intracelluláris kálium kiáramlását, ami a sejtek pusztulásához vezet (Arikan és Rex 2001). Az amphotericin B jelentős aktivitást mutat a

legtöbb *Candida* faj ellen, kivéve a *C. lusitaniae*-t (Sabatelli és mtsai. 2006). Az *A. terreus* kivételével jelentős az aktivitás az *Aspergillus* fajok ellen és a *Mucorales* csoport számos képviselője ellen. Ezen kívül az amphotericin B készítmények aktívak a dimorf gombák, köztük a *Histoplasma capsulatum*, a *Blastomyces dermatitidis*, a *Coccidioides immitis* és *posadasii*, valamint a *Paracoccidioides* fajok ellen (Li és mtsai. 2000 és McGinnis és mtsai. 2001). Tekintettel az amphotericin B korlátozott oldhatóságára és rossz orális biohasznosulásra, minden készítmény parenterális. A gyógyszer hosszú felezési ideje miatt naponta egyszer adagolható. Tekintettel az amphotericin B magas fehérjekötődésére (99%), feltételezhető, hogy a gyógyszer az agyi parenchimában halmozódik fel, és a viszonylag alacsony agyi gerincvelői folyadékszintek miatt nincs kellően magas hatásfoka a meningitis kezelésében (Thompson és mtsai. 2009). Az egyes amphotericin B készítmények eltérő farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkeznek. A lipid-asszociált formák például fokozott központi idegrendszeri penetrációt mutatnak, a többi készítményhez képest 4-7-szer magasabb csúcskoncentrációt érnek el a központi idegrendszerben. Az IDSA jelenlegi irányelvei a lipidalapú amphotericin B formulákat másodvonalbeli terápiaként, a deoxikolát formulát pedig harmadvonalbeli alternatívaként sorolja fel a candidaemia kezelésében (5. ábra). Bár az amphotericin B potens gombaellenes aktivitást mutat, az alkalmazását gyakran a jelentős toxicitás és a lipid-formulációk magas ára korlátozza. A gyakori mellékhatások közé tartozik a vesetoxicitás, az infúziós reakciók, az elektrolit-rendellenességek és a hepatotoxicitás. Az amphotericin B esetében nagyon kevés a gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatások száma, mivel ez a gyógyszer nem metabolizálódik a máj CYP450 enzimjei által (Hamil 2013).



5. ábra: Fajspecifikus terápiás algoritmus a leggyakoribb *Candida* fajok esetében (Pappas és mtsai. 2018)

3.4.2. Triazolok

A triazolok C₁₄-alfa-szterol-demetiláz enzim kompetitív gátlásával megakadályozzák a gomba fiziológiás ergosterol szintézisét, aminek következtében toxikus szterol intermedierek halmozódnak fel a gomba sejtmembránjában (Allen és mtsai. 2015).

A **fluconazol** számos klinikailag releváns *Candida* faj ellen bír sztatikus hatással, beleértve a *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* és *C. dubliniensis* fajokat. A fluconazol kiváló aktivitást mutat a *Cryptococcus neoformans* ellen. A MIC értékek általában magasabbak a *C. glabrata*, *C. guilliermondii* és *C. rugosa* fajok esetében. A *C. krusei* genetikusan rezisztensnek tekinthető (Allen és mtsai. 2015, Nett és Andes 2015). A dimorf gombák esetében a fluconazol iránti MIC értékek jellemzően magasabbak, mint más elérhető azolok (itraconazol, posaconazol, voriconazol, isavuconazol) esetében, ezért a fluconazolt ritkábban alkalmazzák ezen fertőzések kezelésére, kivéve a coccidioidomycosis-t. Az *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium*. és a *Mucorales* fajok genetikai rezisztenciával rendelkeznek (Allen és mtsai. 2015). A fluconazol alacsony molekulatömege és magas oldhatósága miatt egyedülálló szernek számít. Körülbelül 90%-os az orális biohasznosulása, és felszívódását nem befolyásolja a gyomorsav vagy az elfogyasztott étel-ital mennyisége. A fluconazol hatékonyan hatol be a gazdaszervezet legtöbb szövetébe, beleértve a központi idegrendszert is. Terápiás koncentrációkat lehet elérni az agy-gerincvelői folyadékban és a szemüregben, ezen kívül a vizeletben is, mivel elsősorban a veséken keresztül történik a kiválasztás, körülbelül 66-76%-a változatlan formában ürül. A jelenlegi IDSA ajánlások alapján a fluconazol az elsőként választandó szer a nyálkahártya candidiasis kezelésében, valamint első vonalbeli lehetőség az invazív candidiasis célzott terápiájában (5. ábra) (Allen és mtsai. 2015, Nett és Andes 2015).

Az **itraconazol** hasonló spektrummal rendelkezik, mint az imént említett fluconazol. Az itraconazol 2 orális készítményben kapható: kapszula és hidroxipropil-béta-ciklodextrinnel komplexált orális oldat. Intravénás alkalmazásra is formulázták ciklodextrinnel, de ez a készítmény jelenleg nem áll rendelkezésre. A kapszula felszívódása kb. 55%-os, de a gyomor savassága és az ételbevitel hatására javul, ezért szénsavas ital és étel mellett ajánlott a beadása. Az orális oldat kiváló, közel 80%-os biohasznosulással rendelkezik. A betegek közötti variabilitás kisebb ennél a készítménynél, és a szérumkoncentráció jellemzően 30%-kal magasabb, mint a tablettás készítmény esetében. Az itraconazol nagymértékben kötődik a fehérjékhez (99%) (Allen és mtsai. 2015). A fluconazollal és a voriconazollal ellentétben a hatóanyag csak kis mennyiségben penetrál az agy-gerincvelői folyadékba és a szem folyadékkompartmentumaiba. Az itraconazolt számos mikózis kezelésére engedélyezték,

beleértve a blastomikózist, a nyálkahártya-candidiasist, a coccidiomycosist, a cryptococcosist, a histoplasmosist, az onychomikózist és a sporotrichózist. Engedélyezték továbbá neutropeniás betegek gombás fertőzésének empirikus kezelésére és az aspergillózis másodvonalbeli kezelésére (5. ábra) (Allen és mtsai. 2015, Nett és Andes 2015).

A **voriconazol** a fluconazolhoz és az itraconazolhoz sok tekintetben hasonlóan mutat *Candida* ellenes aktivitást. Ezenkívül a voriconazol a fluconazol-rezisztens *C. glabrata* törzsek egy része ellen is hatékony. A voriconazol aktív a *Cryptococcus spp.* és a dimorf *B. dermatitidis*, *C. immitis* és a *H. capsulatum* esetében is. Jó aktivitást mutat a legtöbb *Aspergillus spp.* ellen, beleértve az amphotericin B rezisztens *A. terreus*-t is (Allen és mtsai. 2015). Hatékony továbbá *Fusarium.* és a *Scedosporium* fajok ellen; a *Mucorales* elleni aktivitás azonban mérsékelt. A voriconazol szájon át szedhető tablettá, orális szuszpenzió és intravénás oldat (szulfobutiléter b-ciklodextrinnel komplexálva) formában is elérhető. A biohasznosulás mindkét orális készítmény esetében meglehetősen magas, több mint 90%-os. A felszívódást nem befolyásolja a gyomor savassága (Allen és mtsai. 2015, Nett és Andes 2015). A voriconazol szérumszintje betegenként nagymértékben változhat, elsősorban a metabolizmus eltérései miatt. A voriconazol nagymértékben metabolizálódik a CYP450 enzimek által, és a CYP2C19 elsődleges enzim polimorfizmusai miatt változhat a metabolizmus mértéke. Klinikai vizsgálatok azt mutatják, hogy az 1 és 2 mg/ml közötti szérumszinttel korrelál legjobban a pozitív terápiás kimenetellel. A 6 mg/ml-t meghaladó voriconazol szérumszintek azonban mellékhatásokkal, többek között hepatitisszel és delíriummal járnak. A voriconazol 58%-ban kötődik fehérjékhez. A fluconazolhoz hasonlóan az agyi folyadékban és a szemkompartimentekben a voriconazol szintje eléri a szérumszint 50%-át, ami lehetővé teszi a központi idegrendszer és a szem fertőzéseinek kezelését. Elsőként választandó szernek tekinthető az invazív aspergillozis, nyelőcső candidiasis, scedosporiosis és a *Fusarium* infekciók kezelésében. A voriconazol jobbnak bizonyul az amphotericin B-nél az invazív tüdőaspergillózis kezelésében. Az aspergillozis legtöbb invazív formájának, köztük a sinusitisnek, agytályognak, endocarditisnek, osteomyelitisnek és szeptikus arthritisnek a kezelésére is ez a gyógyszer az elsővonalbeli választás (5. ábra) (Allen és mtsai. 2015, Nett és Andes 2015). Alkalmazásának egyik fontos korlátja, hogy veseelégtelenségben csak a per os formák használhatóak a vénás készítmény ciklodextrin tartalma miatt, valamint az, hogy sok jelentős gyógyszer-interakciója van.

A **posaconazol** és az **isavuconazol** a legtöbb *Candida* faj ellen aktív, ráadásul a voriconazolhoz hasonlóan jó aktivitást mutatnak a fluconazol-rezisztens izolátumok egy részével szemben.

Spektrumuk kiterjed a *C. neoformans*, a *C. immitis*, *B. dermatidis* és a *H. capsulatum* fajokra. Kiváló aktivitást mutatnak az *Aspergillus spp.* ellen, beleértve az *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* és *A. terreus* fajokat (Allen és mtsai. 2015). Továbbá számos *Mucorales* fajjal szemben is jó az aktivitásuk. A posaconazol jelenleg szájon át szedhető szuszpenzió, késleltetett hatóanyag-leadású tabletták és szulfobutiléter b-ciklodextrinnel komplexált intravénás oldat formájában kapható. A felszívódás és a biohasznosulás különbözik a 2 orális készítmény között. Az orális oldat esetében a felszívódás nagymértékben függ a táplálékbeviteltől, ahol a magas zsírtartalmú ételek segítik legjobban a felszívódást. Az itraconazzal és a voriconazzal végzett vizsgálatokhoz hasonlóan a terápiás gyógyszer monitorozás a posaconazol esetében is fontos, különösen az orális szuszpenziós készítmények esetében. A posaconazol nagymértékben kötődik a szérumfehérjékhez (98%) (Allen és mtsai. 2015). A klinikai vizsgálatokból származó adatok alapján a posaconazol gyengén penetrál az agy-gerincvelői folyadékba és a szem különböző részeibe. Az isavuconazonium, az isavuconazol vízben oldódó pro-drugja, szájon át szedhető kapszula és intravénás oldat formájában kapható. A voriconazol és a posaconazol intravénás formuláival ellentétben az isavuconazonium intravénás formulája nem tartalmazza a szulfobutiléter b-ciklodextrin vivőanyagot, így veseelégtelenségben is adható. Az isavuconazolnak hosszú felezési ideje van (> 75 óra), és naponta egyszer kell adni egy 2 napos telítési időszakot követően. Az isavuconazol több, mint 99%-a kötődik a szérumban a fehérjékhez. Az isavuconazol szintje az agy-gerincvelői folyadékban alacsony. A posaconazol engedélyezett az oropharyngeális candidiasis kezelésére és az invazív gombafertőzés profilaxisára. Az isavuconazol elsősorban az invazív aszpergillózis és az invazív mucormycosis kezelésére engedélyezett. Az isavuconazzal kezelt betegek gyógyulási eredményei (31%, illetve 38%) hasonlóak voltak az amphotericin B és a posaconazol korábbi eredményeihez hasonlítva (5. ábra) (Allen és mtsai. 2015, Nett és Andes 2015).

3.4.3. Echinocandinok

Az echinocandinok olyan félszintetikus lipopeptidek, amelyek egy acil-oldallánchoz kötött ciklikus hexapeptidekből állnak (Patil és Majumdar 2017). Az echinocandinok a béta-1,3-glükán szintézis gátlásával fejtik ki antifungális hatásukat. A *Candida* fajok ellen elsősorban fungicid hatás, míg az *Aspergillus* nemzetség tagjai esetében sztatikus hatást figyelhetünk meg. A jelenleg rendelkezésre álló három echinocandin a caspofungin, a micafungin és az anidulafungin. A három echinocandin spektruma és aktivitása nagyon hasonló a klinikailag releváns *Candida* fajok ellen (Patil és Majumdar 2017, Nett és Andes 2015). A *C. parapsilosis*

és a *C. guilliermondii* esetében a MIC értékek gyakran magasabbak, de a klinikai adatok alapján az echinocandinok gyakran még mindig hatékonyak ellenük. Az echinocandinok hatástalannak bizonyultak *C. neoformans*, az endemikus dimorf gombák, a *Mucor* fajok, *Fusarium* fajok, valamint a *Scedosporium* fajok ellen. A *Candida* fajoknál tapasztalt szerzett rezisztencia viszonylag alacsony, 3-5% között változik (Patil és Majumdar 2017). A rezisztencia oka a glükán-szintáz FKS1 alegységében bekövetkező egy vagy több pontmutáció, amely megváltoztatja a glükán-szintáz enzim enzimkinetikai jellemzőit. Érdeemes kiemelni, hogy a *C. glabrata* rezisztenciája világszerte folyamatosan növekszik, jelenleg 3-15%-os arányt jelentenek az irodalmi adatok (Nett és Andes 2015). Az echinocandinok felszívódása a gasztrointesztinális rendszerből nagyon alacsony, így kizárólag intravénás formában érhetőek el. Hosszú felezési idejük (10-26 óra) miatt naponta egyszer adagolhatók. Gyengén penetrálnak a szembe és a központi idegrendszerbe. A caspofungin 96%-ban, a micafungin 99,8%-ban, az anidulafungin megközelítőleg 99%-ban kötődik a szérum fehérjékhez (Nett és Andes 2015). Bár a farmakokinetikájuk elsősorban lineáris lefutást mutat, mindenképp kiemelendő egy fontos farmakokinetikai tulajdonság: a beadott echinocandin dózist követően, az adott antimikotikum felhalmozódik a szöveti környezetben, majd, ha csökken a vérben a gyógyszer koncentráció, az adott antifungális szer folyamatosan visszaáramlik a keringésbe. Ezek alapján a szövetek rezervoárként szolgálhatnak, ami rendkívül fontos tényező az antifungális terápia tervezése során (5. ábra) (Patil és Majumdar 2017, Nett és Andes 2015).

3.5. A *Candida* biofilmek általános jellemzői

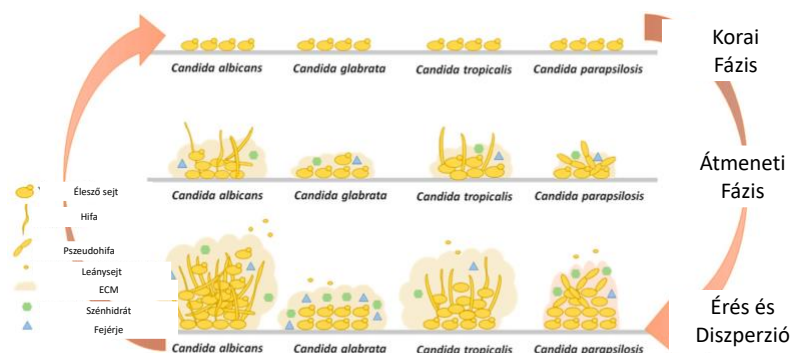
A biofilm olyan mikroorganizmusok szesszilis közössége, amelyek képesek egy összefüggő bevonatot képezni mind abiotikus, mind pedig biotikus felszíneken, miközben extracelluláris poliszacharid alapú mátrixot termelnek maguk köré (Donlan 2001). Az ilyen típusú közösségben lévő mikroorganizmusok alacsonyabb növekedési rátát és nagyobb ellenállóképességet mutatnak az antimikrobiális kezeléssel és a környezeti faktorokkal szemben, továbbá a planktonikus sejtektől élettanilag eltérően viselkedhetnek (Donlan 2001). Az adhézió képessége lehetőséget biztosít az egyes mikrobáknak, köztük a *Candida* fajoknak, hogy biofilmet képezzenek orvosi eszközök felszínén, például intravaszkuláris katétereken, szívbillentyűkön és ízületi protéziseken. A legújabb klinikai kutatások szerint elmondható, hogy a mikrobiális fertőzések csaknem 80%-a köthető biofilm képzéshez (Douglas 2003). A biofilm képződés szempontjából a különböző *Candida* fajok jelentős eltéréseket mutathatnak az extracelluláris mátrix (ECM) jellemzői, a gomba sejtek morfológiája és az antifungális

szerek iránti rezisztencia szempontjából (Sims és mtsai. 2005, Mitchell és mtsai. 2016, Silva és mtsai. 2009). A *C. albicans* érett biofilmjei heterogénebb szerkezetűek, blaszospórákból és hifákból állnak, amelyeket poliszacharid anyagból álló ECM vesz körül. Az ECM egy szilárd „állványzatot” biztosít a sejtek közötti és a különböző felületekhez történő adhézióhoz. A *C. glabrata* esetében a biofilmet kizárólag élesztősejtek alkotják többrétegű szerkezetben vagy szorosan egymáshoz simuló sejtcsoportokban (Chandra és mtsai. 2001). A *C. tropicalis* biofilmje élesztősejtek, pszeudohifák és hifák hálózatából áll, ahol intenzív hifaképződés figyelhető meg (Bizerra és mtsai. 2008). A *C. parapsilosis* esetében a biofilmet a felületre tapadt élesztősejtek klaszterei alkotják, minimális ECM tartalommal (Lattif és mtsai. 2010). Ezek a különbségek rávilágítanak a biofilmképződés alapjául szolgáló folyamatok összetettségére, és arra, hogy nehéz egy olyan terápiát találni, amely ugyanolyan hatékonysággal képes az összes *Candida* biofilm felszámolására (6. ábra) (Cavalheiro és Teixeira 2018).

A *C. albicans in vitro* biofilmképzése során a korai fázis körülbelül 11 órát vesz igénybe, amely során különálló mikrokolóniák alakulnak ki. A biofilmképződés köztes fázisa 12-30 óráig tarthat, amelyet az extracelluláris poliszacharid (EPS) mátrix és egy általában élesztőgombákból, csíratömlőkből és/vagy fiatal hifákból álló kettős réteg kialakulása jellemez. Ezt a fázist követi a *C. albicans* biofilm érése, amely magába foglalja egy vastag EPS-réteg kialakulását, amelyben élesztősejtek és hifák vannak jelen egy sűrű hálózatot alkotva. Az érési folyamat általában körülbelül 38-72 órát vesz igénybe (Chandra és Mukherjee 2015). Az érést követően indul a diszperziós fázis, ahol az érett biofilmekből élesztősejtek szakadnak ki, amelyek gyakran fokozott virulenciával és rezisztensebb fenotípussal rendelkeznek a biofilmet alkotó anyasejtekkel összehasonlítva (Blankenship és Mitchell 2006). Fontos kiemelni, hogy a biofilmképződéssel kapcsolatos legtöbb vizsgálatot *in vitro* végezték. Azonban lényeges különbségek vannak az *in vivo* és *in vitro* biofilmképződésben (Andes és mtsai. 2004). Az *in vivo* biofilmképződés korai fázisának időtartama rövidebbnek bizonyult, mint az *in vitro* megfigyelt időtartam, az *in vivo* biofilmképződés 8 órája után már több réteg élesztősejt és hifa van jelen. Továbbá a *C. albicans* biofilm *in vivo* érése 24 óra alatt lezajlik, ellentétben az *in vitro* megfigyelt 38-72 órával (Andes és mtsai. 2004). A biofilm kialakulásának első döntő lépése az adhézió, amelyet számos adhezin segítségével valósít meg a gomba. Az adhezinek általában glikozil-foszfátidil-inozitol sejtalfelhérjék (GPI-CWP-k), amelyek egy GPI-horgonyt, egy szerin/treonin domént és egy szénhidrát- vagy peptidkötő domént tartalmaznak. A *C. albicans*-ban számos adhezin tartozik az Als (agglutinin-like sequence) családba (Verstrepen és Klis 2006). Az ilyen adhezinekről ismert, hogy C-terminális régiójukon keresztül számos

fehérjéhez képesek kötődni. Az Als család 8 tagja közül az Als3-nak van a legkiemelkedőbb szerepe a biofilmképződésben, mivel deléciója a vad típusú törzsekhez képest súlyos biofilmdéfektushoz vezet (Nobile és mtsai. 2006). A *C. albicans* másik fontos adhezincsaládja a Hwp fehérje család, ahová például a Hwp1 tartozik. A Hwp1 a csíratömlők és a hifák sejtfalának mannoпротеinje, amelynek szerepe van a biofilmképződésben (Modrezewka és mtsai. 2015). A Hwp1 mellett a Hwp család négy másik fehérjéje is szükséges a biofilm kialakulásához: Hwp2, Rbt1, Eap1 és Ywp1. A *C. glabrata*-ban az EPA (epithelial adhesion) család a fő felelőse az adhézióknak. Ezek többségét szubtelometrikus régiókban lokalizált gének kódolják, beleértve az EPA1, EPA2, EPA3 és HYR1 klasztert, valamint az EPA4 és EPA5 klasztert (De Las Penas és mtsai. 2003).

Az adhézió után megkezdődik a biofilmek érése, valamint az EPS termelés (Chandra és Mukherjee 2015). A különböző fajok biofilm mátrixának összetétele nagyban különbözhet. A *C. albicans* termeli a legtöbb EPS-t, amely nagy mennyiségben tartalmaz szénhidrátokat (Al-Fattani és mtsai. 2006, Flemming és Wingender 2010, Zarnowski és mtsai. 2014). A *C. glabrata* biofilmek magas szénhidrát- és fehérjetartalmú mátrixot tartalmaznak. A *C. parapsilosis* biofilm szerkezete a vizsgált törzstől függően változhat, de általában élesztő- és pseudohifa morfológia dominál benne (Al-Fattani és mtsai. 2006, Flemming és Wingender 2010, Zarnowski és mtsai. 2014). Kimutatták, hogy a *C. parapsilosis* biofilmek mátrixát főként szénhidrátok alkotják, alacsony fehérjetartalommal. Mindazonáltal más bizonyítékok azt mutatják, hogy a *C. parapsilosis* biofilmek a *C. albicans*, *C. glabrata* és *C. tropicalis* biofilmekhez képest kevesebb mátrixot tartalmaznak. A *C. tropicalis* biofilmek mátrixa alacsony szénhidrát- és fehérjetartalmú, a felületekről való leválással szemben azonban jóval ellenállóbbak, mint a *C. albicans* által létrehozott szesszilis struktúrák (6. ábra) (Al-Fattani és mtsai. 2006, Flemming és Wingender 2010, Zarnowski és mtsai. 2014). A biofilm kialakulása szempontjából, fontos, hogy a gombasejtek milyen anyagon tapadnak meg. A *C. albicans* vastagabb biofilmeket tud létrehozni a latex és szilikon elasztomer felületeken, míg a biofilmek kisebbek a poliuretánon és a szilikon felszíneken a polivinil-kloridhoz képest. A 6% polietilén-oxidot tartalmazó poliéterurethán jelentősen csökkenti a teljes biofilm biomasszáját, valamint a biofilmben lévő sejtek metabolikus aktivitását. Azonban teflonon például fokozott biofilmképzés figyelhető meg (Sussewind és mtsai. 2015, Chandra és mtsai. 2005, Estivill és mtsai. 2011).



6. ábra: Fajspecifikus biofilmképzés (Carvalho és Teixeira 2018)

A biofilmképződést számos transzkripciós faktor szabályozza, beleértve az adhézióban, a hifaképződésben és az EPS-termelésben részt vevő faktorokat (Nobile és mtsai. 2013). Nobile és mtsai. (2013) 165 transzkripciós faktor deléciós mutánsból álló *C. albicans* könyvtár segítségével azonosították a biofilmképződéshez nélkülözhetetlen transzkripciós faktorokat. Az azonosított biofilm-defektív deléciós mutánsok az *efg1Δ/Δ*, *bcr1Δ/Δ*, *tec1Δ/Δ*, *ndt80Δ/Δ*, *rob1Δ/Δ* és *brg1Δ/Δ* voltak. A *C. albicans* biofilmek fő szabályozói a fonalas növekedésben is részt vesznek. Ilyen az Efg1 és a Cph1, amelyek pozitívan szabályozzák a hifák növekedéséhez szükséges gének, például az ECE1, HYR1, HWP1 és ALS3 expresszióját. A $\Delta efg1$ és $\Delta efg1\Delta cph1$ deléciós mutánsokról kimutatták, hogy képtelenek a filamentációra vagy a biofilm kialakítására (Nobile és mtsai. 2013). A *C. albicans* fonalas növekedésének szabályozásában az Ndt80 transzkripciós faktor is részt vesz. Ezt a szabályozót a sejtek szétválásának, az azolrezisztenciának, a virulenciának és a biofilmképződésnek a szabályozásával is összefüggésbe hozták. Hasonlóképpen a Brg1-nek is szerepe van a *C. albicans*-ban a hifák növekedésével kapcsolatos gének transzkripciós szabályozásában, mivel a BRG1 gén mindkét kópiájának hiánya a hifák fejlődésének károsodásához vezet (Nobile és mtsai. 2013). Eközben a túltermelése a hifaszpecifikus gének, köztük az ALS3, a HWP1 és az ECE1 fokozott expressziójához vezetett. A *C. albicans* Brg1-et viszont az Nrg1 cink-ujj transzkripciós faktor represszálja, amely részt vesz a sejt-morfológia és a patogenitás szabályozásában (Nobile és mtsai. 2013). A hifa növekedés és a biofilmképződés fontos negatív szabályozói a *C. albicans*-ban az Rfg1 és az Nrg1, amelyek down-regulálják az ALS3, ECE1 és HWP1 hifaszpecifikus gének expresszióját. A biofilmmátrix biogenezisének szabályozását a Csr1 központi szabályozó molekula végzi. Pontosabban, a Csr1 negatívan szabályozza a mátrixban jelen lévő béta-1,3-glükán koncentrációját a CSH1 és az IFD6 aktiválásával, valamint a GCA1, GCA2 és ADH5

expressziójának gátlásával (Nobile és mtsai. 2013). A Csr1-ről azt is megállapították, hogy részt vesz a fonalas növekedés szabályozásában (Nobile és mtsai. 2013).

Korábban már több tanulmány is egyértelműen rávilágított, hogy a biofilmképzés és az antifungális rezisztencia között egyértelmű kapcsolat van (Hawser és mtsai. 1995, Kuhn és mtsai. 2002, Nett és mtsai. 2007). Chandra és mtsai. (2001) kimutatták, hogy bár az amphotericin B, a fluconazol, a nisztatin és a klórhexidin MIC értékei 0,5, 1, 8 és 16 µg/ml voltak a *C. albicans* biofilmek korai stádiumában, 72 óra elteltével az amphotericin B, a fluconazol, a nisztatin és a klórhexidin MIC értékei 8, 128, 32 és 256 µg/ml-re változtak. Érdekes módon azonban a hibás biofilmképződést mutató mutánsok, a Δefg1 és $\Delta\text{efg1}\Delta\text{cph1}$, amelyek csak megnyúlt sejtekből álló adherens monoréteget tudtak létrehozni, ugyanolyan érzékenységet mutattak a fluconazzal és az amphotericin B-vel szemben, mint a vad típus (Ramage és mtsai. 2002). További kiemelendő tény a rezisztencia szempontjából a mátrix barrier szerepe (Seneviratne és mtsai. 2008, Mitchell és mtsai. 2015, Nett és mtsai. 2007). Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a vad típusú *Candida* sejtek 20%-kal jobban ellenállnak az amphotericin B-nek mint az EPS defektussal bíró mutáns sejtek. További érdekes tény, hogy a béta-1,3-glükán bizonyítottan kötődik az amphotericin B-hez, míg a mátrixból való hiánya növeli a *C. albicans* érzékenységét a fluconazzal és az amphotericin B-vel szemben (Seneviratne és mtsai. 2008, Mitchell és mtsai. 2015, Nett és mtsai. 2007). A biofilmképzés során a rezisztenciáért felelős gének expressziójában is jelentős változások következnek be. Ide tartozik például a CDR és MDR gének up-regulálása (Song és mtsai. 2009). Úgy tűnik, hogy ez az up-reguláció fontos a gombaellenes rezisztencia kialakulásában a biofilmképzés korai szakaszában, míg az érési folyamatban a szterol-összetétel változásai tűnnek jelentősebbnek. Mindazonáltal kimutatták, hogy az efflux pumpákat kódoló gének (Δcdr1 , Δcdr2 , Δmdr1 , $\Delta\text{cdr1}/\text{cdr2}$ és $\Delta\text{mdr1}/\text{cdr1}$) egyszeri vagy kettős delécióját hordozó *C. albicans* törzsek a szülői törzsekhez hasonlóan képesek biofilmet képezni, és még mindig magasszintű antifungális rezisztencia jellemzi ezeket a törzseket (Song és mtsai. 2009). Ez azt bizonyítja, hogy a biofilmben kialakuló antifungális szer elleni rezisztencia nem egyetlen mechanizmustól függ. Hasonlóan más mikroorganizmusok esetében leírtakhoz, a *C. albicans* által képzett biofilmekben belül is találhatóak úgynevezett perziszter sejtek. A perziszter sejtek nyugvó, nem osztódó sejtek, amelyek nagyfokú toleranciával rendelkeznek az antimikrobiális szerekkel szemben (Lewis 2007).

3.6. A farnesol, mint új potenciális terápiás alternatíva

A biofilmekben belüli kommunikáció alappillére a quorum-sensing nevezetű folyamat, ami egy populációdensitáson alapuló inger-válasz rendszer. Ez a folyamat a központi anyagcsere szempontjából irreleváns. Különböző biológiai funkcióval rendelkező kismolekulatömegű szekretált molekulák szabályozzák, amelyek termelését a populációt alkotó sejtek sűrűsége szabályozza (Albuquerque és Casadevall 2012). A gombák esetében a quorum-sensing egy ismeretlen jelenség volt egészen a 2000-es évek elejéig, amikor Hornby és mtsai. (2001) leírták az első gomba eredetű kommunikációs molekulát, a farnesolt (3,7,11-trimetil-2,6,10-dodekatrién-1-ol), amely központi szerepet játszik a *C. albicans* morfogenezisében.

A *C. albicans* esetében a farnesol a szterolszintézis útvonal melléktermékeként szabadul fel a farnesol-pirofoszfát defoszforilálásával. Ez egy aciklikus szeszkviterpén hőstabil molekula, amely elsősorban aerob körülmények között termelődik, és nem befolyásolja a szélsőséges pH, valamint az elérhető szén- vagy nitrogénforrás típusa (Hornby és mtsai. 2003). Általában a farnesol koncentrációja arányos az élő sejtek számával. Fiziológias körülmények között a *C. albicans* izolátumok átlagosan 35,6 μM (tartomány: 13,7-58,5 μM) farnesolt választanak ki. Ez a koncentráció 35-ször magasabb volt, mint a non-*albicans* fajok által szekretált mennyiség, kivéve a *C. dubliniensis*-t, amely esetében 8,3 μM -t detektáltak (tartomány: 6,0-17,5 μM). Az összes többi non-*albicans* fajra lényegesen alacsonyabb farnesol mennyiség jellemző 0,4 és 1 μM közötti értékeket figyelhetünk meg (Weber és mtsai. 2008).

Egy cDNS microarray analízis alapján a *C. albicans*-ban összesen 274 gén reagál a farnesol expozícióra, amelyek közül 104 gén up-regulálódott, míg 170 gén down-regulálódott (Cao és mtsai. 2005). Élettanilag vizsgálva a farnesol képes befolyásolni a *Candida* sejtek morfológiáját, a biofilmképződést, az efflux pumpák expresszióját, az apoptózist, a fagocitikus választ, a felszíni hidrofobicitást, a vas metabolizmust és a hőstresszel kapcsolatos útvonalakat. Az egyik legjelentősebb farnesollal kapcsolatos hatás a hifa-élesztősejt átalakulás indukciója és a biofilmképződés gátlása. Hangsúlyozni kell, hogy 10% szérumban jelenlétében 150-szer több farnesol szükséges a csíratömlőképzés blokkolásához, ami azt mutatja, hogy nagymértékben képes kötődni a szérumban lévő fehérjékhez (Weber és mtsai. 2010, Langford és mtsai. 2010).

Tekintettel erre a sokrétű szerepre, nem meglepő, hogy ez a vegyület számos központi jelátviteli útvonalat befolyásol a különböző *Candida* fajokban. Az egyik legjobban tanulmányozott farnesollal kapcsolatos útvonal a Ras1-cAMP-PKA kaskád, ahol a farnesol az adenil-cikláz Cyr1 cikláz doménjéhez kötődik ezzel befolyásolva az intracelluláris cAMP szintjét. A farnesol továbbá a kis GTPáz Ras1 hasítását indukálja, ami szolubilis Ras1-et eredményez; a szolubilis

Ras1 a Cyr1 gyenge aktivátora, és elősegíti az élesztősejtek kialakulását. Továbbá közvetlenül is képes gátolni a cAMP jelátviteli útvonalat, elősegítve a hifából élesztővé történő átmenetet. Figyelemre méltó, hogy a farnesol expozíció stabilizálja az Nrg1 fehérjét, amely a hifaképződés negatív szabályozója (Langford és mtsai. 2010).

A reaktív oxigén gyökök termelődését tekintve a szuprafiziológiás farnesol koncentrációk (200-300 μM) a legtöbb gomba számára stresszt okoznak, míg a fiziológiás koncentráció (30-40 μM) megvédi őket a stressztől. Érdeemes kiemelni, hogy a farnesolnak jelentős immunmoduláló hatása is van. Ez a molekula egyaránt képes serkenteni a makrofágok kemokinszintézisét és kiváltani a neutrofil granulociták és monociták aktiválódását. A farnesol-expozíció a monociták dendritikus sejtekké történő differenciálódását is befolyásolja (Polke és mtsai. 2018).

Fiziológiás koncentrációban a farnesolnak nincs jelentős hatása azokra a *Candida* sejtekre, amelyek már megkezdték a hifaképzést vagy a biofilm létrehozását (Hornby és mtsai. 2001). Korábbi eredmények azonban arra utalnak, hogy a farnesol szuprafiziológiás koncentrációban a biofilm strukturális megbontását okozhatja (Ramage és mtsai 2002). Emellett több szerző is publikált olyan tanulmányokat, amelyekben, ha a farnesolt együtt alkalmazták azokkal, a korábban megfigyelt azolrezisztencia megszűnt. Ez a jelenség a Cdr1 efflux pumpák gátlásával, a reaktív oxigén gyökök termelésével vagy a glutation homeosztázis változásával magyarázható (Hornby és mtsai. 2001). A farnesol hatással van az ergosterol szintézishez kapcsolódó génekre is. Dižová és mtsai. (2018) megfigyelték, hogy 200 μM farnesol jelenléte down-regulálja az ERG20, ERG11 és ERG9 géneket. Chen és mtsai. (2018) arról számoltak be, hogy a CYR1 és a PDE2 szabályozza a *C. albicans* biofilmekben a különböző gombaellenes szerekkel szembeni rezisztencia mechanizmusokat. A farnesol azonban a CYR1 és a PDE2 gén expressziójának szabályozásával csökkentheti a *C. albicans* biofilmek rezisztenciáját. Yu és mtsai. (2012) megfigyelték, hogy a szterol bioszintetikus útvonal hozzájárulhat a farnesol gátlóhatásához, mivel az ERG11, ERG25, ERG6, ERG3 és ERG1 gének transzkripciós szintje csökkent a farnesol expozíció követően. Jabra-Rizk és mtsai. (2006) kimutatták, hogy 30-50 mM farnesol-koncentráció a *C. albicans* és a *C. dubliniensis* esetében a fluconazol MIC értékeit a rezisztens értékekről a mérsékelten érzékeny kategóriára változtatja, míg a 100-300 mM koncentráció már fluconazol-érzékenységet eredményezett. A farnesollal és gombaellenes szerekkel végzett kombinációs alapú kísérletek egyik első jelentős áttörését Katragkou és mtsai. (2015) publikálták, akik a *C. albicans* 48 órás biofilmjei ellen szinergizmust találtak a fluconazol, az amphotericin B és a micafungin között farnesol jelenlétében. A non-*albicans* fajok tekintetében Kovács és mtsai. (2016) kimutatták, hogy a farnesol fokozza a caspofungin

és a micafungin aktivitását *C. parapsilosis* izolátumok esetében. Fernández-Rivero és mtsai. (2017) arról számoltak be, hogy a 300 μM farnesol emeli az amphotericin B aktivitását a *C. tropicalis* biofilmekkel szemben.

Korábban a farnesollal végzett állatkísérletek számos kérdést vetettek fel a vegyület *in vivo* alkalmazhatóságát illetően. Az egyik első *in vivo* vizsgálatban Navarathna és mtsai. (2007) arra a következtetésre jutottak, hogy a fiziológiás farnesoltermelés kulcsfontosságú szerepet játszhat a gombák patogenezisében; továbbá az exogén orális és intraperitoneális farnesol adagolás (20 mM) fokozza az egerekben a *C. albicans* okozta mortalitást. Ezekkel az eredményekkel ellentétben Hisajima és mtsai. (2008) protektív hatást figyeltek meg a *C. albicans* ellen az orális candidiasis egérmodelljükben. Meg kell jegyezni, hogy a Hisajima és mtsai. (2008) kísérleteiben a beadott farnesol dózisek (9 μM /egér) 1000-szer alacsonyabbak voltak, mint a Navarathna és mtsai. (2007) által végzett kísérletekben használt farnesol dózis (20 mM/egér). Bozó és mtsai. (2016) nem találtak farnesollal kapcsolatos védőhatást a hüvelyi *C. albicans* fertőzés esetében, ellentétben Hisajima és mtsai. (2008) eredményeivel. Ugyanakkor mindkét alkalmazott farnesol-kezelés fokozta a napi 5 mg/kg fluconazol-kezelés aktivitását a fluconazol-rezisztens *C. albicans* törzs ellen. Hasonló fluconazolrezisztencia-reverziót figyeltek meg planktonikus sejtek esetében Jabra-Rizk és mtsai. (2006) és Cordeiro és mtsai. (2013). Fernandes Costa és mtsai. (2019) farnesolt tartalmazó nanorészecskéket használtak önmagukban és mikonazollal kombinálva; 240 μM -nál nagyobb vagy azzal egyenlő farnesol koncentrációban az élesztő-hifa átmenet gátlását figyelték meg. Ezenkívül a mikonazol (33 mg/L) és farnesolt (2,1 mM) tartalmazó nanorészecskék szignifikánsan gátolták a gombák szaporodását.

4. Célkitűzések

Vizsgálatainkban kíváncsiak voltunk, hogy a Debreceni Egyetem Klinikai Központban a hemokultúrákból izolált *Candida* fajok esetében milyen biofilmtermelési jellemzőket találunk biofilm tömeg és metabolikus aktivitás szempontjából. Továbbá találunk-e bármilyen kapcsolatot a biofilmek jelenléte, a mortalitás és a metabolikus aktivitás között. A vizsgálatok második felében a farnesol expozíció hatását vizsgáltuk *C. auris* klinikai izolátumok ellen, hogy új típusú terápiát javasolhassunk ezen potenciálisan multirezisztens új típusú nozokomiális kórokozó esetében.

Kísérleteink során az alábbiakat tűztük ki célul:

- A hemokultúrákból származó *Candida* izolátumok biofilmképzési tulajdonságainak vizsgálata (biofilm tömeg mérése kristályibolya assay segítségével és a metabolikus aktivitás meghatározása XTT-assay használatával), valamint a planktonikus és szesszilis érzékenységi profiljának feltérképezése.
- Összefüggés keresése a biofilm termelés és a mortalitás, valamint egyéb prediszponáló tényezők, komorbiditási faktorok között. Célunk, hogy meghatározzuk azokat a betegtulajdonságokat, alapteregségeket, amelyek hajlamosíthatnak a biofilmtermelő *Candida* izolátumok által okozott infekcióra.
- A farnesol hatásának *in vitro* vizsgálata *C. auris* planktonikus sejtek és egynapos biofilmek esetében.
- A farnesol és az azolok között fennálló *in vitro* interakció vizsgálata *C. auris* ellen.
- A farnesol *in vivo* hatásának vizsgálata *C. auris*-szal fertőzött neutropeniás egérmodellben.

5. Anyagok és módszerek

5.1. A biofilm képzési vizsgálatra használt izolátumok kiválasztási kritériumai, definíciók

Összesen 127 *Candida* izolátumot vizsgáltunk, amelyeket 2013. januárja és 2018. decembere között gyűjtöttünk a Debreceni Egyetem Klinikai Központjában (1667 ágy) 127 egymástól független candidaemia-s epizódból. Akkor tekintettük az adott klinikai szituációt candidaemia-nak, ha a beteg legalább egy haemokultúrájából valamilyen *Candida* faj tenyésztett ki. Ha ugyanattól a betegtől egynél többször izoláltunk *Candida*-t, különböző candidaemia-s epizódnak tekintettük a két eseményt, amennyiben legalább 30 nap különbséggel történt a két tenyésztés. Azokat a betegeket, akiknél egyidejűleg több *Candida* faj is előfordult ugyanabból az epizódból, kizártuk a vizsgálatból. A betegek demográfiai adatait, az alapbetegségeket és az antimikrobiális terápia részleteit az elektronikus betegdokumentációs rendszerben elérhető kórtörténet áttekintésével gyűjtöttük össze. A candidaemia kimenetelét az első pozitív haemokultúrától számított 30 napig vagy a betegek haláláig követtük.

Fisher-egzakt tesztet használtuk annak vizsgálatára, hogy a biofilmképző izolátumokkal való fertőzésre jobban hajlamosít-e bármiféle kockázati tényező, illetve, hogy az izolátumok biofilmképzése kapcsolatba hozható-e a 30 napos mortalitási adatokkal. Az életkor összehasonlítás vonatkozásában párosítatlan t-próbát alkalmaztunk. A biofilmtermelést, valamint a különböző betegjellemzők és körülmények hatását a betegek halálozására többszemponthozat regressziós modellben elemeztük. A biofilmtömeg és a biofilmek metabolikus aktivitás méréséből származó logaritmizált abszorbancia értékeket, továbbá a beteg jellemzőket használtuk a mortalitás prediktor vizsgálatunkhoz a többváltozós logisztikus regressziós modell segítségével. A táblázatba a szignifikáns esély arányt tüntettük fel. Az eredményeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p érték kisebb volt, mint 0,05.

A vizsgálatot a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága az alábbi engedélyszámon jegyezte be: 5190-2019

5.1.1. A *Candida auris* izolátumok eredete

A *C. auris*-szal kapcsolatos kísérleteinkben három klinikai izolátumot vizsgáltunk (10, 12, 27-es izolátum), amelyek, az Egyesült Királyság Nemzeti Mikológiai Referencia Laboratóriumából származtak (Borman és mtsai. 2017). A vizsgálatok során az SC5314-es *C. albicans* referencia törzset használtuk összehasonlító kontrollként. Fontos hangsúlyozni, hogy

minden vizsgált *C. auris* izolátum nem aggregáló fenotípust mutatott, amelyeknél a *C. albicans*-hoz hasonló patogenitás figyelhető meg.

5.2. A candidaemia-ból származó klinikai izolátumok biofilmképzésének vizsgálata

Az egynapos Sabouraud dextróz agarra (SDA) kikent gombapázsitból fiziológiás sóoldatban egy 25-30 ml-es végtérfogatú szuszpenziót készítettünk. A szuszpenziót háromszor mostuk (3000g fordulaton 3-szor 5 percig). A felülúszó leöntését követően ismételtén 25-30 ml fiziológiás sóoldatba vettük fel a gombasejteket. Az egyes izolátumok esetében RPMI-1640-ben 1×10^6 Colony Forming Unit (CFU)/ml gombaszuszpenziót állítottunk be, majd lapos aljú, 96 lyukú mikrotiter lemez (TPP, Trasadingen, Svájc) szeszilis sejteket tartalmazó üregeibe 0,1 ml-t pipettáztunk. A negatív kontrollnak megfelelő üregekbe 0,1 ml RPMI-1640 került. Ezt követően a plate-eket statikusan inkubáltuk 24 órán keresztül $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on (Pierce és mtsai. 2008; Kovács és mtsai. 2016). Az egynapos biofilmekre 0,1%-os kristályibolya oldatot mértünk (125 μl), ezt követően 15 percet inkubáltuk őket szobahőmérsékleten. Az inkubációt követően a biofilmeket háromszor mostuk steril fiziológiás sóoldattal (200 μl). A lekötött kristályibolya molekulákat szolubilizáltuk 125 μl 33%-os ecetsav hozzáadásával. Negyedóra inkubációt követően 100 μl felülúszót steril mikrotiter lemezbe pipettáztunk. A kapott felülúszó abszorbanciáját 540 nm-en spektrofotométer segítségével mértük le (O'Toole 2011; Marcos-Zambrano és mtsai. 2014).

A metabolikus aktivitás vizsgálatához XTT [2,3-bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide]-assayt (VWR, Debrecen, Magyarország) alkalmaztunk. A háromszor mosott biofilmekhez 100 μl XTT/menadion (0,5 g/l XTT, kiegészítve 1 μM menadionnal) oldatot adtunk. Ezt követően a lemezeket statikusan inkubáltuk 2 órán át, $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on. A metabolikus aktivitás méréséhez 80 μl felülúszót eltávolítottunk az egyes üregekből majd 492 nm-en spektrofotométerrel mértük őket (Pierce és mtsai. 2008). Irodalmi adatok alapján a kristályibolya-assay és az XTT-assay segítségével nyert adatok nem feltétlenül korrelálnak egymással és alapvetően két független biofilm jellemzőt vizsgálnak, ezért az izolátumokat a biomassza mennyiségük és a metabolikus aktivitásuk alapján alacsony, közepes vagy magas biofilmtermelőként, továbbá alacsony, közepes és magas metabolikus aktivitást mutató szeszilis közösségként kategorizáltuk Rajendran és mtsai. (2016) által közölt publikáció szerint. Az első kvartilisbe (Q1) tartozó izolátumokat alacsony biofilmtermelőnek, a harmadik kvartilisnél (Q3) magasabb biomasszával rendelkező izolátumokat magas biofilmképzőnek, a

kettő közöttiek pedig közepes biofilmtermelőnek (Q2) minősítettük. Ennek a besorolásnak az elvét követtük a metabolikus aktivitáson alapuló kategorizálásnál is. A hasonló vizsgálatokkal való jobb összehasonlíthatóság érdekében az izolátumokat a következőképpen vizsgáltuk: alacsony vs. közepes/magas biomassza és alacsony vs. közepes/magas metabolikus aktivitás. A különböző *Candida* izolátumok biofilmtömegét és a biofilmek metabolikus aktivitását Dunn teszttel kiegészített Kruskal-Wallis-teszttel elemeztük.

5.3. A planktonikus sejtek érzékenységeinek vizsgálata

A *Candida* izolátumok fluconazol (Sigma, Budapest, Magyarország), amphotericin B (Sigma, Budapest, Magyarország), caspofungin, micafungin és anidulafungin (Molcan, Torontó, Kanada) iránti MIC érték meghatározását a Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) által jóváhagyott standard mikrodilúciós módszerrel végeztük a szervezet M27-A3-as protokollja alapján. Tápközegként L-glutaminnal kiegészített, hidrogén-karbonát mentes RPMI-1640-et használtunk (pH=7,0), MOPS [3-(N-morpholino) propánszulfonsav) Sigma] puffer hozzáadásával) (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008). A vizsgált gyógyszerkoncentrációk 0,03-32 mg/L, 0,016-8 mg/L és 0,008-4 mg/L volt a fluconazol, az amphotericin B és a három vizsgált echinocandin esetében. Minden izolátumot három párhuzamosban mértünk, és a további elemzéshez a medián eredményeket használtuk. A *C. parapsilosis* ATCC 22019 és a *C. krusei* ATCC 6258 törzseket minden kísérletben kontrolltörzsekként használtuk. A planktonikus MIC értékek leolvasására 24 órás, 35°C-on végzett inkubációs időszakot követően került sor. A fluconazol és a vizsgált echinocandinok esetében a részleges gátlást tekintettük MIC végpontnak (legalább 50%-os turbiditáscsökkenés a növekedési kontrollhoz képest), míg az amphotericin B esetében azt a koncentrációt tekintettük MIC értéknek, ahol először tapasztaltunk 100%-os növekedéscsökkenést a pozitív kontrollal összehasonlítva. A planktonikus és szesszilis sejtek adott antifungális szerekkel szembeni MIC értékeinek különbségeit Wilcoxon matched-pairs teszttel elemeztük.

A *C. auris* izolátumok esetében a fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol és farnesol (mind a Sigma, Budapest, Magyarország) iránti MIC értékek meghatározását a korábbiakhoz hasonlóan standard leveshígítós módszerrel végeztük, a CLSI által elfogadott M27-A3-as protokoll alapján (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008). A vizsgált gyógyszerkoncentrációk 0,5 és 32 mg/L, 0,008 és 0,5 mg/L, illetve 1,17 és 300 µM mg/L között változtak a fluconazol, a többi vizsgált azol és a farnesol esetében. Minden

esetben azt a koncentrációt tekintettük MIC értéknek, ahol először tapasztaltunk 50%-os növekedéscsökkenést a pozitív kontrollal összehasonlítva.

5.4. A biofilmek antifungális szerekkel szembeni érzékenysége

A vizsgált gombaellenes szerek biofilmekkel szembeni aktivitását XTT-assay segítségével vizsgáltuk. A biofilmekkel szembeni MIC meghatározás során vizsgált koncentrációk 0,06-512 mg/l, 0,015-8 mg/l és 0,008-4 mg/l voltak a fluconazol, az amphotericin B és a vizsgált echinocandinok esetében. A *C. parapsilosis* esetében a vizsgált echinocandinok koncentrációja 2 és 1024 mg/L között mozgott. A szesszilis MIC értékek meghatározásához a biofilmeket háromszor mostuk 200 µL steril fiziológiás sóoldattal. Az XTT-assay menete megegyezett a fentebb leírt protokollal. Azt a koncentrációt tekintettük MIC értéknek, ahol először tapasztaltunk 50%-os metabolikus aktivitás csökkenést a kezeletlen kontroll biofilmmel összehasonlítva. A gyógyszer-expozíció által okozott metabolikus aktivitás százalékos változását a következőképpen számoltuk ki: $(A_{\text{üreg}} - A_{\text{negatív kontroll}}) / (A_{\text{pozitív kontroll}} - A_{\text{negatív kontroll}})$, ahol A a mért abszorbancia. Minden izolátumot három független kísérletben vizsgáltunk, és a további elemzéshez a három érték mediánját használtuk. Minden biofilmmel kapcsolatos kísérletben a *C. albicans* SC5314 referencia törzset használtuk minőségi kontrollként. A szesszilis sejtek adott antifungális szerekkel szembeni MIC értékeinek különbségeit Wilcoxon matched-pairs tesztekkel elemeztük (Kovács és mtsai. 2016).

A triazolok és a farnesol egynapos *C. auris* biofilmekkel szembeni aktivitását szintén a fentebb leírt XTT-assay segítségével határoztuk meg. A vizsgált koncentrációk 8 és 512 mg/L, 0,5 és 32 mg/L, 0,125 és 8 mg/L, illetve 1,17 és 300 µM között mozogtak a fluconazol, voriconazol/itraconazol, posaconazol/isavuconazol és a farnesol esetében.

5.5. A farnesol planktonikus növekedésre gyakorolt hatásának a vizsgálata *Candida auris* sejtek esetében

A növekedési vizsgálatokban a farnesol pre-expozíció, valamint a folyamatos farnesol kezelés hatását vizsgáltuk az alábbi kísérleti elrendezésben: (i) különböző farnesol-koncentrációk hatása a planktonikus sejtekkel szemben, (ii) különböző farnesol-koncentrációk hatása a 24 órán keresztül farnesollal (75 µM) pre-exponált planktonikus sejtekkel szemben. A 75 µM

farnesolt azért választottuk pre-expozíciós koncentrációnak, mert ez körülbelül a *C. albicans* fiziológias farnesoltermelésének kétszeresének felel meg, így már szuprafiziológiásnak tekinthető, de még nem mutat cytotoxicitást. (Weber és mtsai. 2008). A vizsgált farnesol koncentrációk minden kísérletben 10, 50, 100 és 300 μM voltak.

A planktonikus sejtek számának csökkenését time-kill kísérletekkel követtük nyomon (Kovács és mtsai. 2014). A mintákat (100 μL) 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 és 24 órákor vettük, minden egyes minta esetében tízes-alapú hígítást végeztünk, majd minden hígításból $4 \times 30 \mu\text{L}$ -t pipettáztunk SDA-ra, ezt követően a táptalajokat 48 órán keresztül 35°C -on inkubáltuk. Minden izolátumot három független kísérletben vizsgáltunk, és a három érték átlagát ábráztuk. Az adott időpontokban Dunnett-tesztel kiegészített egyszempontos variancianalízist alkalmaztunk, hogy elemezzük az élő sejtek számára gyakorolt farnesol hatást. Szignifikánsnak tekintettük az eredményt ha $p < 0,05$ volt.

5.6. A farnesol biofilmre gyakorolt hatásának vizsgálata *Candida auris* sejtek esetében

Három kísérleti protokoll szerint vizsgáltuk a farnesol pre-expozíció és a folyamatos farnesolkezelés hatását a *C. auris* és a *C. albicans* biofilmekre: (i) a biofilmképződés során fennálló 24 órán keresztüli folyamatos farnesolkezelés, (ii) a biofilmképződés előtt 24 órán keresztül farnesollal (75 μM) pre-exponált sejtek biofilmképző képessége, majd a biofilmképződés alatt 24 órán keresztül folyamatos kezelés adott farnesol-koncentrációval, (iii) a különböző farnesol koncentrációk hatása az egynapos biofilmekre. A vizsgált farnesol-koncentrációk minden kísérletben 10, 50, 100 és 300 μM voltak. A szeszilis sejtek metabolikus aktivitását 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 és 24 órákor határoztuk meg XTT-assay segítségével (Hawser, 1996; Katragkou és mtsai. 2015). Minden izolátumot három független kísérletben vizsgáltunk, és a három érték átlagát használtuk az elemzés során. Az adott időpontokban Dunnett-tesztel kiegészített egyszempontos variancianalízist alkalmaztunk a különböző farnesol-koncentrációk által kifejtett metabolikus aktivitás változás elemzésére. A kezelt és a kontroll sejtek értékei közötti különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p érték kisebb volt 0,05-nél.

5.7. Az azolok, illetve a farnesol között fennálló *in vitro* kölcsönhatások vizsgálata

A vizsgált vegyületek között esetlegesen fennálló szinergista kölcsönhatás vizsgálatához kétdimenziós „checkerboard” mikrodilúciós assay-t alkalmaztunk (Meletiadis és mtsai. 2005;

Meletiadis és mtsai. 2010; Katragkou és mtsai. 2015). A kölcsönhatás vizsgálatok esetében a *C. albicans* izolátumoknál eltekintettünk a planktonikus sejtek tesztelésétől, mivel azok fiziológiásan magasabb érzékenységet mutattak a tesztelt szerek iránt. A plate elrendezés általánosan az alábbiak szerint történt: a lemez A sora tartalmazta az egyes farnesol koncentrációkat önmagában, míg a 10. oszlopban a különböző azol koncentrációk voltak megtalálhatóak. A mátrix további üregei a két gyógyszer eltérő kombinációit tartalmazták. A 11. oszlop volt a kezeletlen növekedési kontroll, míg a 12. oszlop az úgynevezett táptalajkontroll. Az interakciók természetét a széleskörben használt gátló koncentrációhányad indexszel (Fractional Inhibitory Concentration Index - FICI) határoztuk meg, amelyet az alábbiak szerint definiáltunk: $\Sigma FIC = FIC_A + FIC_B = MIC_A \text{ kombináció} / MIC_A \text{ önmaga} + MIC_B \text{ kombináció} / MIC_B \text{ önmaga}$, ahol a MIC_A és MIC_B önmagában a két gyógyszer MIC értéke önmagában, míg a MIC_A és MIC_B kombinációban a két gyógyszer MIC értéke az a tesztelt izoeffektív kombinációkban. Az izoeffektív kombinációk esetében meghatároztuk a FIC értéket, melyek közül a legalacsonyabb érték felelt meg a FIC indexnek, amit az alábbiak alapján interpretáltunk: szinergizmus, ha a $FICI \leq 0,5$, indifferens a hatás amennyiben $0,5 < FICI \leq 4$, míg antagonizmusról akkor beszélünk, ha $FICI > 4$ (Meletiadis és mtsai. 2005; Meletiadis és mtsai. 2010; Katragkou és mtsai. 2015).

5.8. A farnesol hatásának *in vivo* vizsgálata neutropéniás egérmodellben

BALB/c neutropéniás nőstény egerek (21-23g) (Charles River) segítségével vizsgáltuk a farnesol pre-expozíció (75 μ M) és a napi farnesol kezelés (75 μ M) hatását egy reprezentatív *C. auris* izolátum és a *C. albicans* SC5314 törzs virulenciájára. Az állatokat a laboratóriumi állatok gondozására és felhasználására vonatkozó irányelveknek megfelelően tartottuk. A kísérleteket a Debreceni Egyetem Állatjóléti Bizottsága (Debrecen, Magyarország) hagyta jóvá (12/2014 DEMÁB számú engedély). Tartós immunszuppressziót 150 mg/kg ciklofoszfamid intraperitoneális beadásával hoztuk létre 4 nappal a fertőzés előtt, ezt követően 100 mg/kg ciklofoszfamidot adtunk 1 nappal a fertőzés előtt, majd 100 mg/kg újbóli ciklofoszfamid adása következett 2 nappal és 5 nappal a fertőzés után (Andes és mtsai. 2010; Kovács és mtsai. 2014). Előzetes kísérleteinknek megfelelően az egereket intravénásan, a laterális farokvénán keresztül fertőztük meg; ahol a fertőző dózisok 1×10^7 CFU/egér és 8×10^3 CFU/egér voltak 0,2 ml térfogatban a *C. auris* és a *C. albicans* esetében. Az egereket négy csoportra osztottuk (csoportonként 10 egeret használtunk); (i) kezeletlen kontroll egerek; (ii) 24 órán keresztül farnesol pre-exponált (75 μ M) sejtekkel történő fertőzés; (iii) a fertőzést megelőzően nem volt

farnesol pre-expozíció, de napi 75 μ M farnesol indult a fertőzést követő 24 órával; (iv) 24 órán át tartó farnesol pre-expozíció (75 μ M) a gombasejteken a fertőzést megelőzően; ezt követően 24 órával a fertőzést követően napi 75 μ M farnesol kezelés kezdődött.

A kezelést intraperitoneálisan adtuk be 0,5 ml térfogatban, fiziológiás sóoldattal hígítva. A kontroll egerek 0,5 ml fiziológiás sóoldatot kaptak intraperitoneálisan. A fertőzés után 6 nappal az egereket elaltattuk, és a veséjüket eltávolítottuk (Fakhim és mtsai. 2018), lemértük, majd aseptikusan homogenizáltuk. A vesékben lévő gombák mennyiségét kvantitatív tenyésztéssel határoztuk meg. A kapott eredményeket Dunn-teszttel kiegészített Kruskal-Wallis teszttel elemeztük. Szignifikáns volt az eredmény, ha a p érték kisebb volt, mint 0,05.

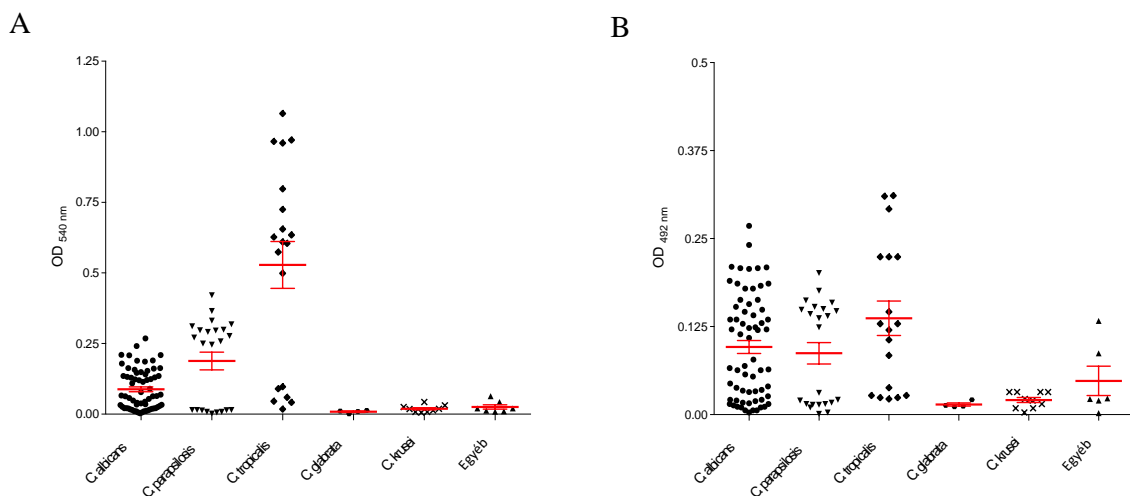
A kezelt és kezeletlen egerek veséit szövettani vizsgálatoknak is alávetettük. A szövettani vizsgálatot és a szövettani festést rutinszerűen formalinban rögzített, paraffinba ágyazott egérvese-szöveteken végeztük. A paraffin blokkokból 4 μ m vastagságú metszeteket vágunk, és PAS festést végeztünk (Pupim és mtsai. 2017).

6. Eredmények

6.1. A biofilmképzési epidemiológiai vizsgálatok eredményei

A vizsgált klinikai izolátumok többsége férfibetegből származott (59%), a betegek átlagéletkora 61 év volt. A betegek 79%-át intenzív osztályon kezelték. A *Candida* fajok prevalenciáját tekintve a *C. albicans* volt a leggyakrabban izolált faj; a vizsgált candidaemia-s epizódok 51%-áért (65/127) volt felelős, öt követte a *C. parapsilosis* (23/127; 18%), a *C. tropicalis* (19/127; 15%), a *C. krusei* (10/127; 8%), *C. glabrata* (4/127; 3%) és egyéb, kevésbé gyakori fajok (6/127; 5%) a *C. lyopolitica*, *C. catenulata*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. inconspicua* és *C. orthopsilosis* egy-egy candidaemia-s epizódot okoztak.

A 7. ábra A és B része azt mutatja, hogy a biofilm tömege és a szesszilis sejtek metabolikus aktivitása meglehetősen heterogén volt, függetlenül a vizsgált fajoktól. A *C. tropicalis* izolátumok szignifikánsan nagyobb biofilmtömeeggel rendelkeztek a többi *Candida* fajhoz képest ($p = 0,001-0,05$); továbbá metabolikus aktivitásuk is szignifikánsan magasabb volt a *C. glabrata* és a *C. krusei* fajokkal összehasonlítva ($p = 0,01-0,05$; 7-es ábra A és B).



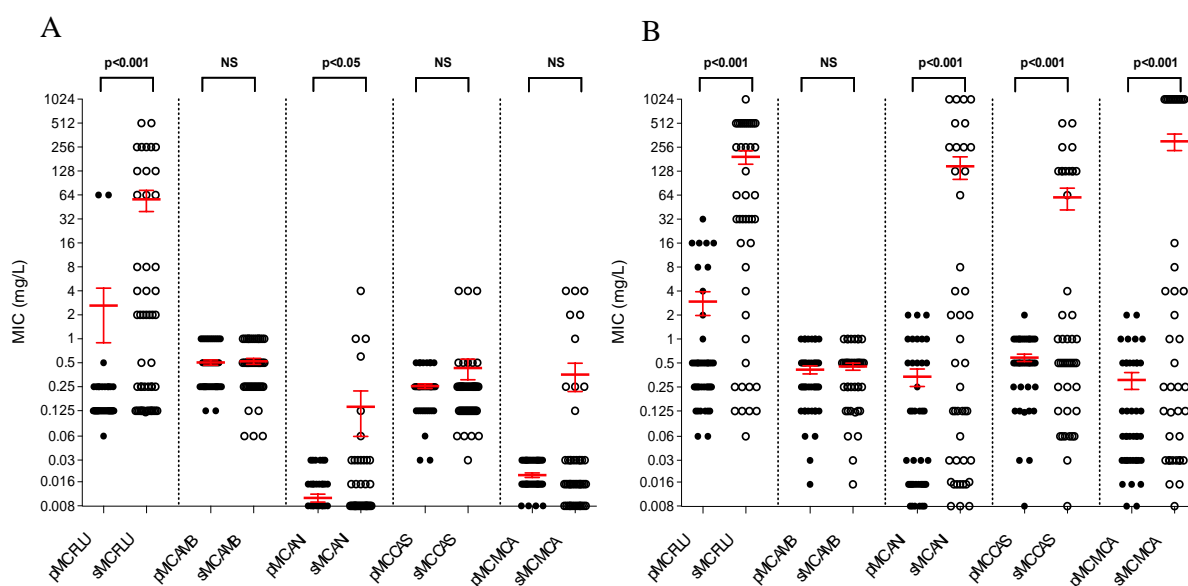
7. ábra: A vizsgált *Candida* izolátumok kristályibolya assay-el mért biofilmtömege (A) és a biofilmek metabolikus aktivitása (B). A piros vonalak jelzik az adott csoportban mért átlagot és a szórást.

A különböző *Candida* izolátumok által termelt biofilm tömegét kristályibolya assay segítségével mértük. Az izolátumokat alacsony (Q1), közepes (Q2) vagy magas (Q3) biofilmtermelőnek minősítettük: alacsony kategóriába soroltuk, ha abszorbanciájuk kisebb volt, mint 0,01 (OD_{540 nm}), közepesnek számított, ha az abszorbancia 0,01 és 0,276 közé esett (OD_{540 nm}), míg magas biofilmtermelésről 0,276-os (OD_{540 nm}) értékektől beszéltünk. Tizenöt, 42 és 8 *C. albicans*; 8, 7 és 8 *C. parapsilosis*; 12, 7 és 0 *C. tropicalis*; 4, 6 és 0 *C. krusei*; valamint 1, 3

és 0 *C. glabrata* minősült alacsony, közepes és magas biofilmtermelőnek. Ami a kevésbé gyakori fajokat illeti, a vizsgált *C. catenulata* és *C. inconspicua* izolátumok alacsony biofilmtermelőnek, míg a *C. lypolitica*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis* és *C. orthopsilosis* izolátumok a határértékek alapján közepes biofilmtermelőnek bizonyultak.

A kristályibolya alapú vizsgálatokhoz hasonlóan a különböző szesszilis *Candida* izolátumokat metabolikus aktivitásuk alapján szintén kategorizáltuk XTT-assay segítségével. Alacsony (Q1), metabolikus aktivitásúnak tekintettük azokat az izolátumokat, amelyek abszorbanciája kisebb volt, mint 0,019 (OD_{492 nm}), közepesnek számított (Q2), ha az abszorbancia 0,0019 és 0,149 közé esett (OD_{492 nm}). Magas metabolikus aktivitásról (Q3) 0,149-es (OD_{492 nm}) értékektől beszéltünk. Tizennégy, 34 és 17 *C. albicans*; 8, 8 és 7 *C. parapsilosis*; 0, 13 és 6 *C. tropicalis*; 4, 6 és 0 *C. krusei*; és 3, 1 és 0 *C. glabrata* rendelkezett alacsony, közepes és magas metabolikus aktivitással. A vizsgált *C. catenulata* alacsony metabolikus aktivitású, míg a *C. inconspicua*, *C. lypolitica*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis* és *C. orthopsilosis* izolátumok közepes metabolikus aktivitásúak voltak.

Az izolátumok medián planktonikus MIC értékei 0,125 és > 32 mg/l; 0,06 és 1 mg/l; 0,008 és 2 mg/l; 0,03 és 1 mg/l; illetve 0,008 és 2 mg/l között mozogtak a fluconazol, az amphotericin B, az anidulafungin, a caspofungin és a micafungin esetében. Az érvényben lévő CLSI breakpoint-ok alapján 3 *C. albicans* és valamennyi *C. krusei* esetében fluconazol rezisztenciát figyeltünk meg. Továbbá az egyik *C. inconspicua* izolátum csökkent érzékenységet mutatott a fluconazolra (MIC = 8 mg/L). Az összes fluconazol-rezisztens *C. albicans* törzs, 8 *C. krusei* izolátum és egy *C. inconspicua* alacsony biofilmtömeget és alacsony metabolikus aktivitást mutatott. Az echinocandin rezisztencia tekintetében 19 *C. albicans*, 6 *C. tropicalis*, 6 *C. krusei* és 3 *C. glabrata* törzs mutatott mérsékelt érzékenységet a caspofunginnal szemben. Echinocandinokra rezisztens izolátumokat nem találtunk (8A és B ábra).



8. ábra: A vizsgált planktonikus (pMIC) és szesszilis izolátumok (sMIC) érzékenységi profilja a fluconazol (FLU), amphotericin B (AMB), anidulafungin (ANI), caspofungin (CAS) és a micafungin (MICA) esetében. Az A ábrarész mutatja a *C. albicans* izolátumokat, míg a B része az ábrának a non-*albicans* izolátumokat prezentálja.

A *C. albicans* esetében a medián szesszilis MIC értékek 0,125 és 512 mg/l; 0,06 és 1 mg/l; 0,008 és 4 mg/l; 0,03 és 4 mg/l; illetve 0,008 és 4 mg/l között mozogtak a fluconazol, az amphotericin B, az anidulafungin, a caspofungin és a micafungin esetében (8A ábra). A non-*albicans* fajok biofilm MIC értékeinek mediánja 0,06 és 1024 mg/l; 0,016 és 1 mg/l; 0,008 és 1024 mg/l; 0,008 és 512 mg/l; illetve 0,008 és 1024 mg/l között mozgott a fluconazol, az amphotericin B, az anidulafungin, a caspofungin és a micafungin esetében (8B ábra). A *C. albicans* szesszilis MIC értékei a fluconazolra és az anidulafunginra szignifikánsan magasabbak voltak a planktonikus MIC értékekhez képest ($p = 0,001-0,05$). Hasonlóképpen, a non-*albicans* fajok esetében a fluconazol, az anidulafungin, a caspofungin és a micafungin szesszilis MIC értékei szignifikánsan magasabbak voltak a planktonikus MIC értékekhez képest ($p < 0,001$; 8. ábra A és B).

Megvizsgáltuk a biofilm tömege, metabolikus aktivitása, valamint a betegek komorbiditási jellemzői közötti kapcsolatot (1. táblázat, 2. táblázat). A legmagasabb 30 napos mortalitást a *C. tropicalis* candidaemia (68%) esetében figyeltük meg, ezt követte a *C. albicans* (62%), a *C. parapsilosis* (30%), a *C. krusei* (30%) és a *C. glabrata* (25%). Szignifikánsan magasabb 30 napos mortalitást tapasztalhattunk a közepes és magas biofilmtömeg esetében (61%) ($p = 0,023$; 1. táblázat). Figyelemre méltó, hogy az összes *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* és *C. glabrata* izolátum, amelynél letális kimenetelű volt a candidaemia, a közepes/magas kategóriába

tartozott mind a biofilmtömeg, mind a metabolikus aktivitás tekintetében, míg ez az arány 85% volt a *C. albicans* izolátumok esetében. A kapott klinikai adatok alapján a szolid malignus daganatos megbetegedések a közepes/magas biofilmtermelő *Candida* izolátumokkal való fertőzésekhez kapcsolódtak ($p = 0,043$; 1. táblázat). A metabolikus aktivitás tekintetében a 30 napos halálzási arány szignifikánsan magasabb volt ($p = 0,01$) a közepes/magas metabolikus aktivitással rendelkező biofilmképző *Candida* törzsek által okozott fertőzésekben (62%; 2. táblázat). Ezzel szemben az alacsony metabolikus aktivitású *Candida* biofilmekhez 33%-os halálzási arány társult (2. táblázat). Érdekes módon a bakteraemia aránya szignifikánsan magasabb volt ($p = 0,015$) az alacsony metabolikus aktivitású *Candida* fajok esetében (53% és 28% volt a bakteraemia aránya az alacsony metabolikus aktivitású és a közepes/magas metabolikus aktivitású biofilmek esetén; 2. táblázat). A regressziós analízis kimutatta, hogy a közepes/magas metabolikus aktivitású biofilmet termelő izolátummal való fertőződés a halálzás független előrejelzője lehet (3B táblázat), míg ez a korreláció nem látszódott a kristályibolya-alapú biofilmtömeg meghatározással kapott eredményekben (3A táblázat).

	Összes (n=127)	Alacsony biofilmtömeg (n=30)	Közepes/Magas biofilmtömeg (n=97)	p-érték
Átlag életkor (tartomány)	61 (1-90)	51 (1-89)	62 (1-90)	0,714
Férfi	75 (59 %)	21 (70 %)	54 (56 %)	0,204
Izolált <i>Candida</i> faj				
<i>C. albicans</i>	65 (51 %)	15 (50 %)	50 (52 %)	1,000
<i>C. glabrata</i>	4 (3 %)	1 (3 %)	3 (3 %)	1,000
<i>C. parapsilosis</i>	23 (18 %)	8 (27 %)	15 (15 %)	0,181
<i>C. tropicalis</i>	19 (15 %)	0 (0 %)	19 (20 %)	0,007
<i>C. krusei</i>	10 (8 %)	4 (13 %)	6 (6 %)	0,245
egyéb <i>Candida spp.</i>	6 (5%)	2 (7 %)	4 (4 %)	0,626
Intenzív terápiás osztály	100 (79 %)	25 (83 %)	75 (77 %)	0,613
Immunszuppresszió	13 (10 %)	3 (10 %)	10 (10 %)	1,000
Endovasculáris katéter	99 (78 %)	26 (87 %)	73 (75 %)	0,218
Mesterséges lélegeztetés	87 (69 %)	19 (63 %)	68 (70 %)	0,506
Parenterális táplálás	68 (54 %)	17 (57 %)	51 (53 %)	0,834
Cukorbetegség	41 (32 %)	6 (20 %)	35 (36 %)	0,121
Magasvérnyomás	51 (40 %)	11 (36 %)	40 (41 %)	0,832

Hematológiai rosszindulatú daganat	9 (7 %)	3 (10 %)	6 (6 %)	0,440
Szolid malignitás	19 (15 %)	1 (3 %)	18 (19 %)	0,043
Hasi sebészeti beavatkozás	8 (6%)	3 (10 %)	5 (5 %)	0,392
Bacteraemia	43 (34 %)	12 (40 %)	31 (32 %)	0,509
30-napos mortalitás	70 (55 %)	11 (37 %)	59 (61 %)	0,023
Szisztémás antibiotikum	91 (72 %)	25 (83 %)	66 (68 %)	0,163
Antifungális terápia				
Fluconazol	102 (80 %)	26 (87 %)	76 (78 %)	0,433
Voriconazol	5 (4 %)	1 (3 %)	4 (4 %)	1,000
Amphotericin B	13 (10 %)	3 (10 %)	10 (10 %)	1,000
Caspofungin	15 (12 %)	3 (10 %)	12 (12 %)	1,000
Micafungin	14 (11 %)	1 (3 %)	13 (13 %)	0,185
Anidulafungin	3 (2 %)	1 (3 %)	2 (2 %)	0,558
Kombinációs antifungális terápia	31 (24 %)	7 (23 %)	24 (25 %)	1,000

1. táblázat: A candidaemia-ban szenvedő betegek *Candida* véráramfertőzésének hajlamosító tényezői, mikrobiológiai jellemzői és klinikai változói, beleértve az alcsoportok összehasonlítását a biofilm tömege alapján. Fisher-egzakt tesztet használtunk annak vizsgálatára, hogy a biofilm tömeg, valamint a klinikai/mikrobiológiai jellemzők között van-e szignifikáns összefüggés. Az életkorok vonatkozásában párosítatlan T-próbát alkalmaztunk. Az eredményeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a *p* érték kisebb volt, mint 0,05.

	Összes (n=127)	Alacsony metabolikus aktivitás (n=30)	Közepes/Magas metabolikus aktivitás (n=97)	<i>p</i>-érték
Átlag életkor (tartomány)	61 (1-90)	63 (1-89)	61 (1-90)	0,345
Férfi	75 (59 %)	20 (67 %)	55 (57 %)	0,398
Izolált <i>Candida</i> faj				
<i>C. albicans</i>	65 (51 %)	14 (47 %)	51 (53 %)	0,677
<i>C. glabrata</i>	4 (3 %)	3 (10 %)	1 (1 %)	0,041
<i>C. parapsilosis</i>	23 (18 %)	8 (27 %)	15 (15 %)	0,181
<i>C. tropicalis</i>	19 (15 %)	0 (0 %)	19 (20 %)	0,007
<i>C. krusei</i>	10 (8 %)	4 (13 %)	6 (6 %)	0,245
egyéb <i>Candida</i> spp.	6 (5%)	1 (3 %)	5 (5 %)	1,000
Intenzív terápiás osztály	100 (79 %)	25 (83 %)	75 (77 %)	0,613
Immunszuppresszió	13 (10 %)	3 (10 %)	10 (10 %)	1,000
Endovasculáris katéter	99 (78 %)	25 (83 %)	74 (76 %)	0,614

Mesterséges lélegeztetés	87 (69 %)	21 (70 %)	66 (68 %)	1,000
Parenterális táplálás	68 (54 %)	18 (60 %)	50 (52 %)	0,530
Cukorbetegség	41 (32 %)	8 (27 %)	33 (34 %)	0,509
Magasvérnyomás	51 (40 %)	15 (50 %)	36 (37 %)	0,286
Hematológiai rosszindulatú daganat	9 (7 %)	3 (10 %)	6 (6 %)	0,440
Szolid malignitás	19 (15 %)	3 (10 %)	16 (16 %)	0,560
Hasi sebészeti beavatkozás	8 (6%)	4 (13 %)	4 (4 %)	0,088
Bacteraemia	43 (34 %)	16 (53 %)	27 (28 %)	0,015
30-napos mortalitás	70 (55 %)	10 (33 %)	60 (62 %)	0,01
Szisztémás antibiotikum	91 (72 %)	28 (93 %)	63 (65 %)	0,002
Antifungális terápia				
Fluconazol	102 (80 %)	26 (87 %)	76 (78 %)	0,433
Voriconazol	5 (4 %)	0 (0 %)	5 (5 %)	0,591
Amphotericin B	13 (10 %)	2 (7 %)	11 (11 %)	0,731
Caspofungin	15 (12 %)	6 (20 %)	9 (9 %)	0,191
Micafungin	14 (11 %)	4 (13 %)	10 (10 %)	0,739
Anidulafungin	3 (2 %)	0 (0 %)	3 (3 %)	1,000
Kombinációs antifungális terápia	31 (24 %)	9 (30 %)	22 (23 %)	0,468

2. táblázat: A candidaemia-ban szenvedő betegek *Candida* véráramfertőzésének hajlamosító tényezői, mikrobiológiai jellemzői és klinikai változói, beleértve az alcsoportok összehasonlítását a biofilmek metabolikus aktivitása. Fisher-egzakt tesztet használtunk annak vizsgálatára, hogy a metabolikus aktivitás, valamint a klinikai/mikrobiológiai jellemzők között van-e szignifikáns összefüggés. Az életkorok vonatkozásában párosítatlan T-próbát alkalmaztunk. Az eredményeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p -érték $< 0,05$ volt.

A)

	Érték \pm Standard hiba	p-érték
Intercept	-2,380 \pm 0,866	0,006
Életkor	0,038 \pm 0,01	0,003
Endovaszkuláris katéter	-1,457 \pm 0,691	0,004
Mesterséges lélegeztetés	2,476 \pm 0,642	0,0001
Parenterális táplálás	1,203 \pm 0,507	0,018
Hasi műtéti beavatkozás	-2,098 \pm 0,841	0,013
Intenzív terápiás osztály	-1,483 \pm 0,722	0,039
Szisztémás antibiotikum használat	1,131 \pm 0,549	0,039

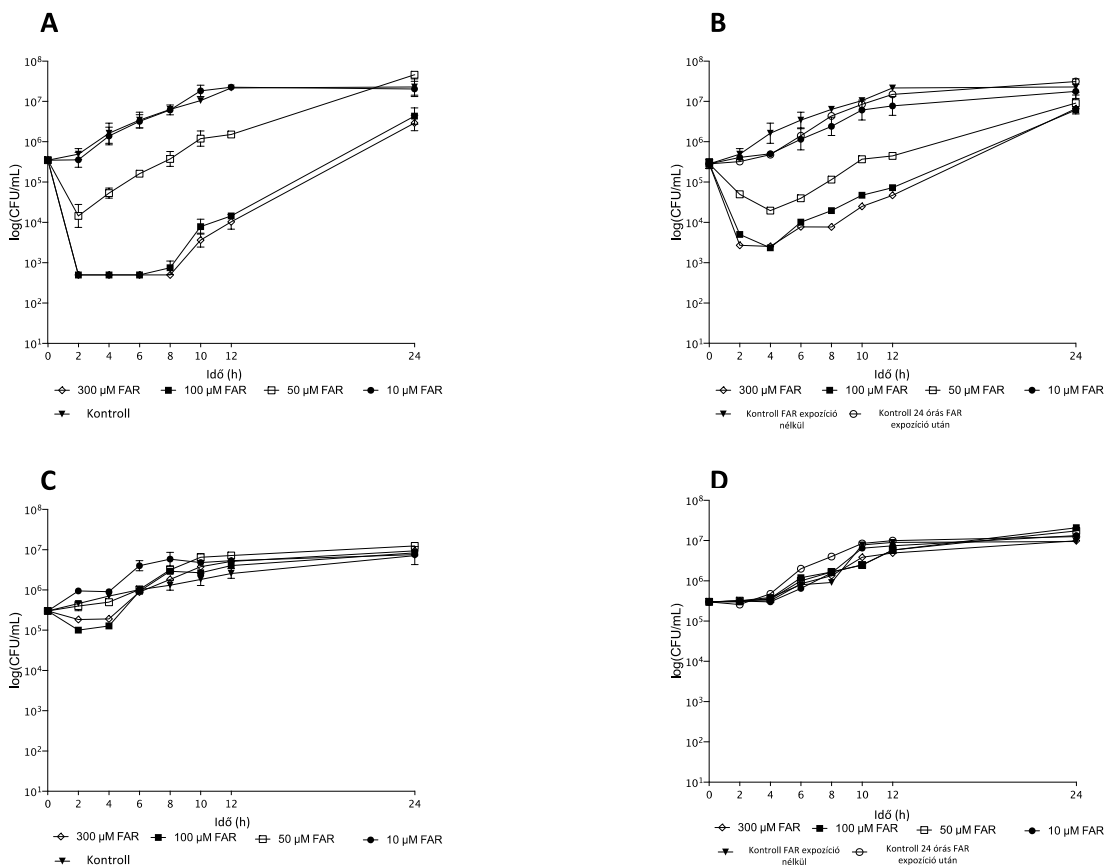
B)

	Érték ± Standard hiba	p-érték
Intercept	-0,348 ± 0,804	0,665
Log XTT abszorbanca	0,432 ± 0,181	0,017
Életkor	0,031 ± 0,009	0,0008
Endovaszkuláris katéter	-1,542 ± 0,649	0,017
Mesterséges lélegeztetés	1,742 ± 0,537	0,001
Parenterális táplálás	1,235 ± 0,503	0,014
Hasi műtéti beavatkozás	-1,906 ± 0,914	0,037

3. táblázat: A biofilmtermelés (logaritmizált abszorbancaértékek a kristályibolya assay (A) vagy XTT-assay után kapott adatokból (B)), valamint a különböző betegjellemezők és körülmények hatása a beteghalálásra többváltozós regressziós modell segítségével. Az eredményeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a $p < 0,05$.

6.2. A farnesol hatása a *Candida albicans* és a *Candida auris* planktonikus sejtekre

A farnesol szignifikánsan gátolta a *C. auris* sejtek növekedését az első 12 órában az 50 és 300 μM farnesol közötti koncentrációtartományban mindkét kísérleti modellünkben, vagyis farnesol pre-exponált sejteket használva és pre-expozíció mentes sejteket vizsgálva ($p = 0,001-0,05$) (9A és B ábra). Huszonnégy óra elteltével a 100 és 300 μM farnesol mindkét kísérleti modellben jelentősen csökkentette az életképes sejtek számát a kezeletlen kontroll sejttséghez képest ($p = 0,001-0,01$) (9A és B ábra). Meglepő módon 24 óráig sem a farnesol pre-exponált, sem pedig a normál, expozíció mentes *C. albicans* sejtek nem mutattak szignifikáns növekedés csökkenést ($p > 0,05$) (9C és D ábra).



9. ábra: A farnesol általi idő-ölés görbék a *Candida auris* (A,B) és *Candida albicans* (C,D) izolátumok esetében RPMI-1640-ben. Az A és C ábra mutatja a normál, farnesol expozícióon nem átesett sejteket, míg a B és D ábrarész az előzetesen farnesol-exponált sejteket prezentálja (75 µM). Az egyes időpontok az izolátumokhoz tartozó élősejtszámok átlagát mutatják ± szórás (izolátumonként három független kísérlet után).

6.3. A farnesol hatása a *Candida albicans* és a *Candida auris* biofilmképzésére, valamint az 1-napos biofilmekre

6.3.1. A különböző farnesol-koncentrációk hatása a biofilmképző képességre

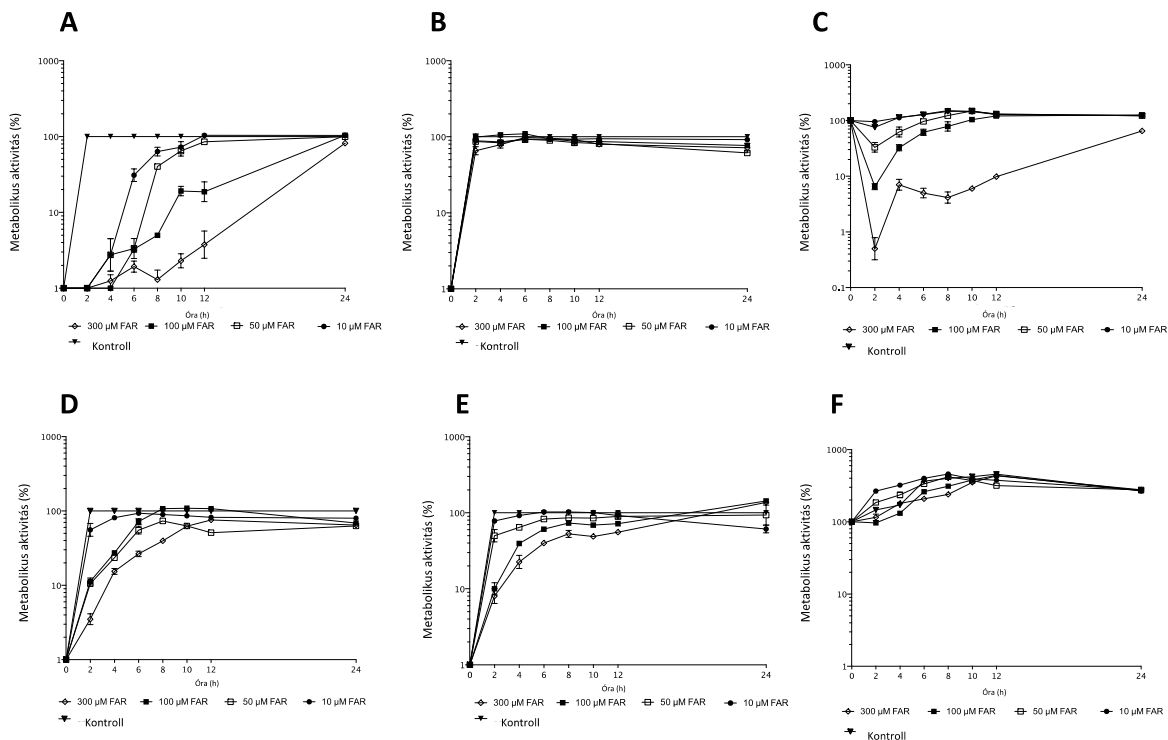
Minden vizsgált farnesol-koncentráció gátolta a *C. auris* sejtek metabolikus aktivitását a kontrollsejtekhez képest az első 8 órában ($p = 0,001-0,05$); míg a 24 órás expozíciót követően statisztikailag hasonló metabolikus aktivitást mértünk a kontroll sejtekkel összehasonlítva ($p > 0,05$) (10A ábra). Ezzel szemben minden vizsgált farnesol-koncentráció szignifikánsan gátolta a *C. albicans* sejtek metabolikus aktivitását a vizsgált 24 órában (10D ábra).

6.3.2. A biofilmképződést megelőzően 24 órán keresztül farnesollal (75 µM) elő-exponált sejtek biofilmképző képessége

Érdekes módon a *C. auris* sejtek metabolikus aktivitásában csak 24 óránál tapasztaltunk statisztikailag szignifikáns különbséget, ebben az esetben is csak az 50 és 300 μM volt látható ez a differencia (10B ábra). A *C. albicans* esetében az 50 és 300 μM közötti koncentrációkon metabolikus aktivitásban statisztikailag szignifikáns különbségeket először 8 óránál figyeltünk meg (10E ábra), de a különböző koncentrációkkal kezelt sejtek metabolikus aktivitása 24 óránál statisztikailag már nem különbözött (10E. ábra).

6.3.3. A különböző farnesol-koncentrációk hatása az egynapos biofilmekkel szemben

Kettő és 24 óra között a 300 μM farnesol kezelés erős biofilmellenes hatást fejtett ki a *C. auris* ellen a kontrollhoz képest a metabolikus aktivitás szempontjából (10C ábra). Ezzel szemben, érdekes módon, az alacsony farnesol-koncentrációk (10-50 μM) növelték a *C. albicans* biofilmek metabolikus aktivitását az első 4 órában (10F ábra). Huszonnégy óra elteltével a különböző farnesol kezelések hatásai azonban statisztikailag nem különböztek szignifikánsan a *C. albicans* esetében (10F ábra).



10. ábra: A metabolikus aktivitás időbeli változása biofilmképződés esetén adott különböző farnesol-koncentrációk (10-300 μM) jelenlétében a *C. auris* (A) és a *C. albicans* (D) esetében. A metabolikus aktivitás időbeli változása a farnesolnak előzetesen kített sejtek (75 μM) biofilmképzése esetén adott farnesol-koncentrációk (10-300 μM) jelenlétében a *C. auris* (B) és a *C. albicans* (E) esetében. Az anyagcsere-aktivitás időbeli változása egynapos biofilmek esetében adott farnesol koncentrációk (10-300 μM) jelenlétében a *C. auris* (C) és a *C. albicans* (F) esetében. Az egyes időpontok az izolátumok metabolikus aktivitásának átlagát mutatják \pm szórás (izolátumonként három független kísérlet után).

6.4. A planktonikus és szesszilis *Candida albicans* és *Candida auris* sejtek érzékenységi profilja

A *C. auris* izolátumok esetében a planktonikus MIC értékek 4 és > 32 mg/l, 0,03 és 0,06 mg/l, 0,008 és 0,015 mg/l, 0,015 és 0,03 mg/l, illetve 0,008 és 0,015 mg/l között mozogtak a fluconazol, voriconazol, izavuconazol, itraconazol és posaconazol esetében. A 10-es izolátum fluconazol iránti érzékenysége magasabb volt, mint a fluconazol MIC breakpoint (> 32 mg/l), míg a másik két törzs érzékenynek bizonyult a fluconazolra (Centers for Disease Control and Prevention, 2020). A planktonikus *C. albicans* SC5314 referenciatörzs esetében a MIC-értékek mediánja 0,125 mg/l, 0,015 mg/l, 0,015 mg/l, 0,125 mg/l és 0,008 mg/l volt a fluconazol, voriconazol, isavuconazol, itraconazol és posaconazol érzékenységi vizsgálata során. A biofilmek esetében mért medián MIC értékeket az 4. táblázat mutatja.

Izolátumok	Medián sMIC értékek				Interakció	
	sMIC önállóan		sMIC kombinációban		Medián FICI	Az interakció típusa
	FLU (mg/L)	FAR (µM)	FLU (mg/L)	FAR (µM)		
10	>512 ^a	300	64	75	0,375	Szinergizmus
12	>512 ^a	300	64	75	0,35	Szinergizmus
27	>512 ^a	300	64	75	0,375	Szinergizmus
SC5314	>512 ^a	150	64	75	0,56	Indifferens
	VOR (mg/L)	FAR (µM)	VOR (mg/L)	FAR (µM)		
10	64	150	0,5	4,69	0,093	Szinergizmus
12	64	300	0,5	4,69	0,061	Szinergizmus
27	64	300	0,5	9,38	0,038	Szinergizmus
SC5314	16	150	1	4,69	0,09	Szinergizmus
	ITRA (mg/L)	FAR (µM)	ITRA (mg/L)	FAR (µM)		
10	16	300	0,5	4,69	0,155	Szinergizmus
12	32	300	0,5	9,375	0,140	Szinergizmus
27	16	300	0,5	9,375	0,123	Szinergizmus
SC5314	8	150	0,5	4,69	0,187	Szinergizmus
	POSA (mg/L)	FAR (µM)	POSA (mg/L)	FAR (µM)		
10	16	150	0,25	2,34	0,062	Szinergizmus
12	16	150	0,25	2,34	0,062	Szinergizmus
27	16	150	0,25	2,34	0,062	Szinergizmus
SC5314	2	150	0,25	4,69	0,28	Szinergizmus
	ISA (mg/L)	FAR (µM)	ISA (mg/L)	FAR (µM)		
10	4	300	0,125	9,38	0,091	Szinergizmus
12	8	300	0,125	18,75	0,062	Szinergizmus
27	4	300	0,125	9,38	0,091	Szinergizmus
SC5314	8	150	0,5	4,69	0,28	Szinergizmus

4. táblázat: A fluconazol (FLU), voriconazol (VOR), itraconazol (ITRA), posaconazol (POSA) és isavuconazol (ISA) minimális gátló koncentrációja önmagában és farnesollal (FAR) kombinálva *Candida auris* (10, 12 és 27) és *Candida albicans* SC5314 biofilmek (sMIC) ellen. Továbbá a fluconazol, voriconazol, itraconazol, posaconazol és isavuconazol *in vitro* kölcsönhatásának természete a frakcionált gátló koncentrációs index (FICI) meghatározásával a *Candida auris* és *Candida albicans* biofilmek ellen. Három független kísérletből származó MIC értékek és FICI értékek mediánját mutatja be a táblázat. ^aMIC >512 mg/l esetén a vizsgált koncentrációtartományon kívül van, ezért 1024 mg/l (a legmagasabb vizsgált koncentrációnál egy hígítással magasabb) értéket használtunk az elemzéshez.

6.5. A triazolok és a farnesol közötti interakciók természete a *Candida auris* és *Candida albicans* biofilmek esetében

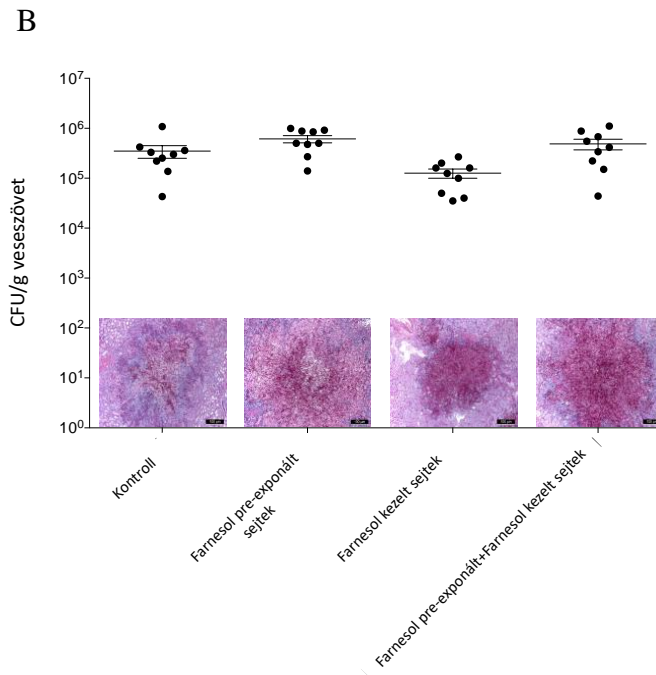
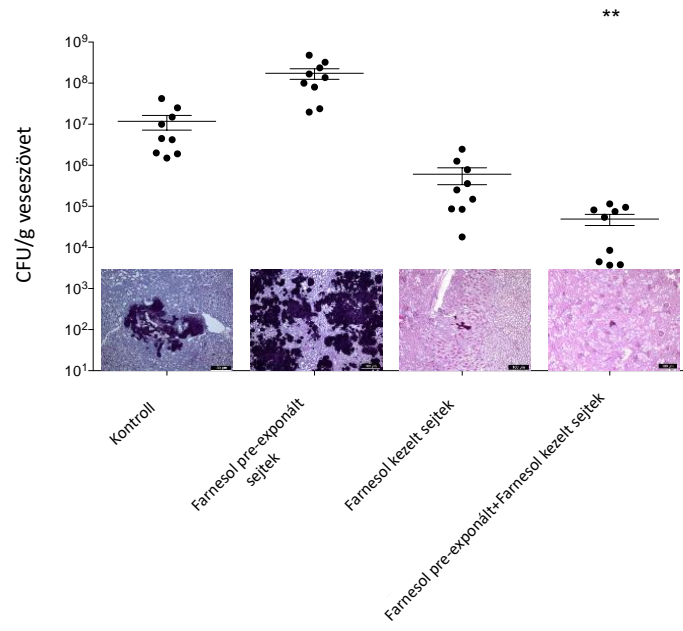
A *C. auris* planktonikus sejtek esetében csak indifferens kölcsönhatásokat detektáltunk. A triazol-farnesol kölcsönhatás eredményeit 1-napos biofilmekkel szemben a FICI alapján az 4. táblázat foglalja össze. Antagonizmus soha nem volt megfigyelhető. A triazolok és a farnesol közötti szinergia mindhárom *C. auris* izolátum esetében megfigyelhető volt a szesszilis sejtek

esetében (FICI 0,038 és 0,375 között) (4. táblázat). A *C. albicans* SC5314 törzsnél a megfigyelt kölcsönhatási mintázat nagyon hasonló volt a *C. auris*-hoz; azol-farnesol közötti indifferens kölcsönhatás csak a fluconazol esetében volt megfigyelhető, bár a számított FICI-érték nagyon közel volt a szinergizmus küszöbértékéhez (4. táblázat).

6.6. A farnesol hatásának *in vivo* vizsgálata *Candida albicans* és *Candida auris* esetében

Az *in vivo* kísérletek eredményeit a 11. ábra mutatja a *C. auris* (A) és a *C. albicans* (B) esetében. A 75 µM farnesol kezelés jelentősen csökkentette a veséből kitenyészett élő gombasejtek számát, különösen akkor, ha a farnesollal előzetesen exponált *C. auris* sejteket használtuk inokulumként (11A ábra). A *C. albicans* esetében minden kísérleti beállítás statisztikailag hasonló élő gombasejtszámot eredményezett a kezeletlen kontrollhoz képest (11B ábra). A megfigyelt szövettani eredmények összhangban voltak a kvantitatív tenyésztéssel kapcsolatos eredményekkel. A *C. auris* fertőzés önálló élesztősejteket és számos bimbózó élesztősejtet hozott létre a kezeletlen kontroll egerekben. Habár a farnesollal előzetesen exponált *C. auris* sejtek beoltása nagyszámú gombasejt aggregátumot okozott a veseszövetben; a napi farnesol kezelés jelentősen csökkentette az elváltozások számát (11A ábra). Mind a farnesol pre-expozíció, mind a napi farnesol kezelés több nagy kiterjedésű patológiás elváltozást okozott a veseszövetben a *C. albicans* fertőzés esetén (11B ábra), ahol minden csoportban megfigyelhetőek voltak önálló és bimbózó élesztősejtek, pszeudohifák, valamint valódi hifák is (11B ábra).

A



11. ábra: Az ábrák az élő gombasejtek számát mutatják *Candida auris*-szal (A) és *Candida albicans*-szal (B) szisztémásan fertőzött egérmódelben. A ** jelzés $p < 0,01$ szignifikanciát jelöl. A szisztémás candidiasisban szenvedő egerek veseszövetének szövettani változásait PAS festéssel vizsgáltuk.

6.7. A társszerzők közreműködése az értekezés alapjául szolgáló közlemények elkészítésében

Az értekezés alapjául szolgáló két közlemény társszerzői az alábbi munkafolyamatokban vettek részt:

Vitális E, Nagy F, Tóth Z, Forgács L, Bozó A, Kardos G, Majoros L, Kovács R. Candida biofilm production is associated with higher mortality in patients with candidaemia. Mycoses. 2020 Apr;63(4):352-360. doi: 10.1111/myc.13049.

- A kísérleti terv elkészítése: Dr. Vitális Eszter, Dr. Kovács Renátó, Dr. Majoros László
- A klinikai izolátumok azonosítása: Dr. Vitális Eszter, Dr. Nagy Fruzsina, Tóth Zoltán
- Érzékenységi meghatározás és biofilm képzési vizsgálatok: Dr. Vitális Eszter, Dr. Nagy Fruzsina, Dr. Bozó Aliz, Tóth Zoltán, Forgács László
- Statisztikai analízis: Dr. Kovács Renátó, Dr. Kardos Gábor
- Az eredmények összegzése: Dr. Vitális Eszter, Dr. Kovács Renátó, Dr. Majoros László
- Kézirat revízió: Dr. Kovács Renátó

Nagy F, Vitális E, Jakab Á, Borman AM, Forgács L, Tóth Z, Majoros L, Kovács R. In vitro and in vivo Effect of Exogenous Farnesol Exposure Against *Candida auris*. Front Microbiol. 2020 May 20;11:957. doi: 10.3389/fmicb.2020.00957.

- A kísérleti terv elkészítése: Dr. Nagy Fruzsina, Dr. Vitális Eszter, Dr. Kovács Renátó
- A klinikai izolátumok azonosítása: Dr. Nagy Fruzsina, Tóth Zoltán, Forgács Lajos, Dr. AM Borman
- A planktonikus és növekedési vizsgálatok elvégzése: Dr. Nagy Fruzsina, Dr. Vitális Eszter, Tóth Zoltán, Dr. Jakab Ágnes
- Érzékenységi vizsgálatok: Dr. Vitális Eszter, Dr. Nagy Fruzsina
- In vivo kísérletek: Dr. Kovács Renátó, Dr. Vitális Eszter, Forgács Lajos
- Statisztikai analízis: Dr. Kovács Renátó
- Eredmények összegzése: Dr. Vitális Eszter, Dr. Nagy Fruzsina, Dr. Kovács Renátó, Dr. Majoros László
- Kézirat revízió: Dr. Kovács Renátó

7. Megbeszélés

A candidaemia továbbra is az egyik legmagasabb mortalitási adatokkal bíró fajtája az invazív candidiasisnak, amely továbbra is komoly veszélyt jelent a kórházak fekvőosztályain, különösen az intenzív terápiás osztályokon (Wisplinghoff és mtsai. 2004, Tang és mtsai. 2018, Schwab és mtsai. 2018). Korábbi epidemiológiai tanulmányok kiemelkedően magas candidaemia incidenciát azonosítottak Pakisztánból (21 eset/100 000), Brazíliából (14,9/100 000), illetve Oroszországból (8,29/100 000). Az átlagosnál alacsonyabb incidenciát publikálnak Jamaikából (5/100 000), Ausztriából (2,1/100 000) és Portugáliából (2,2/100 000) (Bongomin és mtsai. 2017). Az európai számok tekintetében elmondható egy, szinte az egész kontinenst lefedő metaanalízis alapján, hogy a candidaemia incidenciája Európában 3,88 eset 100 000 betegre vetítve, ami 79 esetnek felel meg naponta (Koehler és mtsai. 2019). Első olvasásra nem tűnik magas számnak, azonban ehhez a relatíve kevés esethez magas mortalitási adatok társulnak (40-50%). Számos tanulmány szerint a biofilmet termelő izolátumokkal fertőzött betegek prognózisa szignifikánsan rosszabb; azonban azt érdemes kiemelni, hogy több egymásnak ellentmondó tanulmány is létezik, amely diszkrepancia általában a különböző betegbeválasztási kritériumokban, illetve a biofilmképzés eltérő határértékeiben keresendő. Egy további lehetséges ok a vizsgált betegpopulációk nagyfokú változékonysága lehet (Munoz és mtsai. 2018, Ramage és mtsai. 2016).

Jelenleg két *in vitro* metódust (kristályibolya-assay, XTT-assay) használnak széleskörben a biofilmképzés meglétének értékelésére (Munoz és mtsai. 2018, Ramage és mtsai. 2016). Ezen módszerek preferenciájának oka a relatíve olcsó és könnyű kivitelezés, továbbá egyik módszer sem tekinthető invazívnak és nem jár a sejtek közvetlen roncsolásával, mint más kísérleti megközelítések (pl. az életképes sejtek áramlási citometriával történő számlálása). Ami jelenleg komoly limitáló tényezője a biofilmmel foglalkozó epidemiológiai tanulmányoknak, vagy éppen a biofilmekkel kapcsolatos alaputatásnak, az az, hogy egyelőre nincs általánosan elfogadott konszenzus a biofilm termelési pozitívitás kritériumairól (O'Toole 2011, Hawser 1996).

Jelen vizsgálatunkban, mindkét elterjedt módszer alkalmazásával értékeltük a biofilmek tömegének, valamint a metabolikus aktivitásuknak a candidaemia-k mortalitására gyakorolt hatását. Jelenleg nincs elfogadott határérték arra vonatkozóan, hogy mikortól is beszélünk biofilmképzésről egy adott *Candida* izolátum esetében, ezért Rajendran és mtsai. (2016) által javasolt módszert alkalmaztuk annak eldöntésére, hogy biofilmképző-e az adott izolátum. Rajendran és mtsai. (2016) az XTT-assay, a kristályibolya-assay és a SYTO-9 festés alapján

jelentős különbséget találtak az alacsony és a magas biofilmtermelő izolátumokkal fertőzött betegek 30-napos túlélése között (35% és 41%-os volt a mortalitás az alacsony, illetve magas biofilmképző törzsek esetében). Vizsgálatukban mindhárom teszt magas korrelációt mutatott a biofilmképzési képesség és a candidaemia kimenetele között. Ezek a megfigyelések összhangban vannak a Tumbarello és mtsai. (2012) által publikált eredményekkel, akik az XTT-assay alapján 51%-os mortalitást mutattak ki a biofilmet termelő izolátumok okozta candidaemia-ban, szemben a biofilmet nem termelő izolátumok esetén tapasztalt 32%-kal. Ezzel szemben Pongrácz és mtsai. (2016), valamint Muñoz és mtsai. (2018) nem erősítették meg a biofilmtermelést, mint a mortalitás kockázati tényezőjét a candidaemia-s esetekben.

Eredményeink alapján a biofilmet termelő *Candida*-izolátumok okozta candidaemia-hoz társuló 30-napos mortalitás szignifikánsan magasabb volt a közepes és magas metabolikus aktivitással rendelkező izolátumok esetén, mint az alacsony metabolikus aktivitást mutató törzsek által okozott véráramfertőzések esetén (1. táblázat, 2. táblázat). Emellett fontos kiemelni, hogy a közepes/magas metabolikus aktivitás a mortalitás szignifikáns prediktorának bizonyult a többváltozós regressziós elemzésben (3. táblázat).

Muñoz és mtsai. (2018), valamint Shin és mtsai. (2002) nem találtak korrelációt a kristályibolyával vagy szafraninnal nyert biofilmtömeg adatok és a mortalitás vonatkozásában. Azonban érdemes megjegyezni, hogy Shin és mtsai. (2002) vizsgálatában nagy arányban szerepeltek *C. parapsilosis* izolátumok, amelyek az alacsony virulenciájuk miatt kisebb százalékban okoznak végzetes kimenetelt. Ez a tény jelentősen torzíthatta a kutatócsoport eredményeit. A korábban is hivatkozott tanulmányban Rajendran és mtsai. (2016) a biofilm vastagságát, annak robusztusságát a halálozás szignifikáns prediktoraként határozták meg. Tanulmányunkban a kevés biofilmet termelő izolátumokkal fertőzött betegek körében a halálozás szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a közepes/magas biofilmtömeget mutató izolátumokkal fertőzött egyének esetében. Azonban a kristályibolya-assay segítségével mért biofilmtömeg nem számított a halálozás független prediktorának a többváltozós regressziós modellünk alapján (3. táblázat).

Amennyiben a predisponáló tényezőket vizsgáljuk, tanulmányunkban nagyobb arányban izoláltunk biofilmet termelő törzseket malignus tumoros megbetegedésben szenvedő betegek esetében (1. táblázat, 2. táblázat). Komor és mtsai. (2012) bebizonyították, hogy az intravénásan beadott planktonikus *Pseudomonas aeruginosa* képes felhalmozódni az egér szubkután tumorokban; emellett bizonyítékot szolgáltatott arra is, hogy a baktériumsejtek a tumorszövetben szesszilis vagyis biofilm fenotípust mutatnak. Pawar és mtsai. (2014) kimutatták, hogy a *Salmonella enterica serovar Typhimurium* képes behatolni szolid

tumorokba, és a *P. aeruginosa*-hoz hasonlóan biofilmet termelni. A recens irodalmi adatok alapján jóval kevesebb bizonyíték áll rendelkezésre a gombák biofilm termelése, valamint a rák közötti kapcsolatra. Mindazonáltal a szájnyalkahártyán lévő elváltozások nagyobb valószínűséggel mennek át malignus folyamatokba, ha egyidejűleg *Candida* fertőzés is van jelen. Ráadásul a *Candida* sejtek adhéziója és biofilm termelése fokozott a beteg nyálkahártyáján sugárterápiát követően, akár az élősejt számot nézzük, akár a biofilm kiterjedésének nagyságát, ami összefüggésbe hozható az adott betegcsoportban megfigyelhető magasabb gombás nyálkahártya-fertőzések arányával (Diaz és mtsai. 2019, Nishii és mtsai. 2019, Jahanshiri és mtsai. 2018)

Tanulmányunkban az esetek 34%-ában figyeltünk meg bakteraemiával társuló candidaemiát, ami összhangban van a korábban leírt, 6% és 34,5% közötti arányokkal (1. táblázat, 2. táblázat). Érdekes módon a candidaemia és az egyidejű bakteraemia aránya jelentősen magasabb volt az alacsony metabolikus aktivitású biofilmet termelő *Candida*-izolátumok esetében. A baktériumok felszabadíthatnak bizonyos vegyületeket, amelyek megzavarhatják a planktonikus és szesszilis *Candida*-sejtek anyagcseréjét, zavarhatják a biofilmtermelést vagy a gombasejtek közötti quorum-sensing-et. Morales és mtsai. (2013) kimutatták, hogy a *P. aeruginosa*-ból származó fenazinok károsítják a *C. albicans* metabolikus aktivitását, befolyásolják a sejt-morfológiát, a sejt-sejt kölcsönhatásokat és a biofilmképződést. Graham és mtsai. (2017) megfigyelték, hogy az *Enterococcus faecalis* egyik bakteriocinja gátolja a baktériumok növekedését, ami szintén hatással van a metabolikus aktivitásra, negatív értelemben. Jelen elemzésünk tehát megerősítette, hogy a biofilmek termelése, különösen a közepes/magas metabolikus aktivitással bíró biofilmek esetében, összefüggést mutat a magasabb mortalitással a candidaemia-ban szenvedő betegek esetében. Továbbá rávilágít arra a tényre, hogy a biofilmek tömegének és a metabolikus aktivitásnak egyenértékűnek vett eredménye ellentmondásos konklúziókat eredményez, ezért ezeket a faktorokat az ilyen és hasonló típusú vizsgálatokban külön-külön kell elemezni és interpretálni.

Bár már több mint 10 éves klinikai múltra tekint vissza, a *C. auris* továbbra is nagy kihívást jelent a klinikai gyakorlatban. Ez a potenciálisan multirezisztens faj nagy arányban képes candidaemia-t okozni, amelyekhez magas mortalitás társul különösen az intenzív osztályokon (Scorzoni és mtsai. 2017). Eradikálását nehezíti az izolátumok biofilmképző képessége, amely miatt új, innovatív terápiákra lehet szükség a jövőben ezen faj ellen. A szisztémás gombás fertőzések kezelésére rendelkezésre álló szerek száma erősen limitált; ráadásul a gombaellenes gyógyszerek felfedezése lassú és nagy kihívást jelentő feladat, különösen az újonnan megjelenő, nehezen kezelhető fajok esetében, mint például a *C. auris* (Roemer és Krysan, 2014;

Scorzoni és mtsai. 2017). A *C. auris* fertőzések terápiás alternatívájaként kombinációs alapú kezelési megközelítéseket javasolnak. A flucitozin amphotericin B-vel vagy micafunginnal való kombinációja hatékony lehet a *C. auris* fertőzések ellen (Bidaud és mtsai. 2019). Sőt, a micafungin és a voriconazol között is egyértelmű szinergista kölcsönhatást figyeltek meg (Fakhim és mtsai. 2017), hasonlóan az isavuconazole és caspofungin közötti interakcióhoz. Az utóbbi években egyre többet tudunk a quorum-sensing megzavarásán alapuló alternatív terápiás lehetőségekről (Mehmood és mtsai. 2019), amelyekben a farnesol vagy a tyrosol potenciális antimikrobiális hatását vizsgálták. Számos *in vitro* és *in vivo* tanulmányt végeztek a farnesol antimikrobiális hatásainak felderítésére, amelyekből kiderült, hogy ez a vegyület potenciálisan monoterápiás hatóanyagként vagy tradicionális antifungális szerrel együtt alkalmazva, adjuvánsként szolgálhat (Katragkou és mtsai. 2015; Bozó és mtsai. 2016; Kovács és mtsai. 2016; Nagy és mtsai. 2019). A farnesol fiziológiás koncentrációban sokoldalú hatással rendelkezik, ezek közül azonban a legkiemelkedőbb, hogy képes befolyásolni a *C. albicans* morfológiáját (Hornby és mtsai. 2001). Figyelemre méltó, hogy a farnesol nem csak a *C. albicans*-ra van hatással, hanem - különösen szuperfiziológiás koncentrációban – más, non-*albicans* fajokra és penészgombákra is figyelemre méltó gátlást fejt ki (Rossignol és mtsai. 2007; Weber és mtsai. 2010; Kovács és mtsai. 2016).

Egy korábbi vizsgálatunkban leírtuk, hogy a farnesol potenciális gombaellenes hatással rendelkezik a *C. auris* biofilmekkel szemben (Nagy és mtsai. 2019), mindazonáltal a farnesol esetében megfigyelt gombaellenes aktivitás háttérben álló fiziológiai folyamatok ezidáig még tisztázásra vártak. Eredményeink alapján a farnesol nem volt hatással a planktonikus *C. albicans* sejtek növekedésére; a *C. auris* esetében azonban jelentős növekedés gátlást eredményezett (9. ábra). A szesszilis sejtek vonatkozásában a farnesol az első 24 órában gátolta az egynapos biofilmek metabolikus aktivitását, ami a *C. albicans*-nál egyértelműen hiányzott (10. ábra).

Több epidemiológiai tanulmány is beszámolt már *C. auris* okozta katéter-asszociált fertőzésekről, amelyek a korábban már széles körben dokumentált biofilmtermelésnek köszönhetőek (Dewaele és mtsai. 2018). Korábbi vizsgálatok a *C. auris* által okozott centrális vénás fertőzések magas prevalenciájáról számoltak be: a különböző vizsgálatokban az összes invazív *C. auris* fertőzés 11-92%-a kapcsolódott centrális vénás kanül jelenlétéhez (Lee és mtsai. 2011; Schelenz és mtsai. 2016; Taori és mtsai. 2019). Bár a szesszilis közösségek a gyakran használt antifungális szerek többségével szemben lényegesen nagyobb rezisztenciát mutatnak a planktonikus érzékenységhöz képest (Kean és Ramage 2019), az antimikotikumok

hatékonysága fokozható olyan adjuvánsokkal, mint például a farnesol (Nagy és mtsai. 2019). A vizsgált triazolok és a farnesol között egyértelmű szinergizmust mutattunk ki a *C. auris* biofilmek ellen, hasonlóan az echinocandinok és a farnesol kombinációihoz (Nagy és mtsai. 2019) (4. táblázat). Valószínűsíthetően a farnesol interferál az ergoszterin bioszintéziséhez kapcsolódó gének expressziójával, ami magyarázatot adhat e vegyület és a triazolok szinergiájára (Yu és mtsai 2012).

Bár a farnesol *in vitro* hatása jól ismert, különösen a *C. albicans* ellen, *in vivo* szerepe továbbra is ellentmondásos és számos kérdést vet fel a klinikai alkalmazhatóságát illetően. Navarathna és mtsai. (2007) kimutatták, hogy az exogén farnesol (20 mM/egér) fokozhatja a *C. albicans* patogenitását, növelve a mortalitást a szisztémás candidiasis egérmodellben. Ezzel szemben Hisajima és mtsai. (2008) farnesol által kiváltott protektív hatást figyeltek meg (9 μ M/egér dózisban) a *C. albicans*-asszociált oropharyngeális candidiasisban. Bár Bozó és mtsai. (2016) kimutatták, hogy a farnesol önmagában nem protektív vulvovaginitisben (150-300 μ M/egér), de fokozza a fluconazol aktivitását a fluconazol-rezisztens *C. albicans* izolátumokkal szemben. Fernandes Costa és mtsai. (2009) mikonazol és farnesolt tartalmazó kitozán nanorészecskéket hoztak létre, ahol a farnesol koncentrációja ≥ 240 μ M volt, amely szintén gátolta a gombasejtek szaporodását a vulvovaginitisben szenvedő egerekben (Fernandes Costa és mtsai.2019).

Jelen vizsgálatunkban a napi farnesol kezelés csökkentette a *C. auris* élő gombasejtek számát az egér veséiben, függetlenül az inokulum korábbi farnesol-expozíciójától (11. ábra). Ezenkívül a farnesolnak előzetesen kitett inokulumok esetében a gombasejtek számának csökkenése statisztikailag szignifikáns volt, ami összhangban van az *in vitro* növekedéssel kapcsolatos eredményeinkkel (11. ábra). A megfigyelt gombaellenes aktivitás a korábban *in vitro* mért megemelkedett reaktív oxigén gyök szintekkel magyarázható, amelyek a *C. albicans*-szal végzett hasonló kísérletekben nem voltak kimutathatók. Továbbá, a farnesol lipofil tulajdonságai lehetővé teszik a gomba sejtmembránba való beépülését, befolyásolva a membránok fluiditását és integritását (Bringmann és mtsai. 2000; Funari és mtsai. 2005; Jabra-Rizk és mtsai. 2006; Scheper és mtsai. 2008). Egy korábbi vizsgálat tanulsága szerint a farnesol befolyásolta a sejt polarizációt és a membránpermeabilitást *C. parapsilosis* és *C. dubliniensis* esetében (Jabra-Rizk és mtsai. 2006; Rossignol és mtsai. 2007), ami szintén magyarázhatja a vizsgálatunkban megfigyelt gombaellenes hatást. Figyelemre méltó eredmény, hogy a farnesollal előzetesen exponált sejtek beoltása napi farnesol terápia nélkül virulensebb infekciót és nagyobb veseszöveti károsodást eredményezett az egerekben. A 24 órás farnesol pre-expozíció további folyamatos farnesol kezelés nélkül befolyásolhatja a virulencia faktorok

expresszióját, illetve a membrántulajdonságokat a fluconazol pre-expozícióhoz hasonlóan, ami magyarázatot adhat a virulenciafokozó hatásra (Navarathna és mtsai. 2005).

Kutatásaim egy részében a candidaemia-ban tapasztalható mortalitás és a biofilm termelés közötti kapcsolatot vizsgáltam, ahol egyértelműen megállapítottuk, hogy a biofilmek metabolikus aktivitása szignifikáns hatással van a candidaemia esetében tapasztalt 30-napos túlélésre. A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy a farnesol által indukált antifungális hatás hátterében milyen élettani jellemző van, valamint mi lehet az oka a megfigyelt antifungális hatásnak. Eredményeink alapján új perspektíva nyílt a *C. auris* okozta infekciók terápiájában, továbbá a candidaemia-k vizsgálataiból kapott eredmények nagyban hangsúlyozzák a biofilm termelés fontosságát, amelyek jelenléte vagy hiánya meghatározhatja a candidaemia-s esetek kezelését.

A kísérletek során kapott legfontosabb új eredmények:

1. A *Candida* biofilmekhez (különösen a közepes/magas metabolikus aktivitást mutatók esetén) magasabb 30-napos mortalitási adatok társultak.
2. A farnesol kezelés koncentráció függő módon gátolta a *C. auris* biofilmképzését.
3. A farnesol szinergista interakciót mutatott azokkal a *C. auris* biofilmek esetében.
4. *In vivo* a napi farnesol kezelés szignifikánsan csökkentette a vesékből kitenyészett élő *C. auris* sejtek számát.

8. Összefoglalás

A candidaemia az invazív candidiasis egy relatíve gyakori és életveszélyes formája, amely elsősorban a kórházi betegek körében okoz súlyos problémát. Emellett számos újonnan megjelenő *Candida* faj, mint például a *Candida auris*, hozzájárul a candidaemia-k aggasztó halálozási és epidemiológiai trendjéhez. A biofilmképzés számos *Candida* faj esetében fontos virulenciafaktor; azonban a *Candida*-k biofilmképző képességének hatása a klinikai kimenetelre továbbra is ellentmondásos. Ráadásul a biofilmellenes és/vagy a *C. auris* elleni hatékony terápiás kezelési módok száma erősen korlátozott; ezért sürgősen szükség van új stratégiák kifejlesztésére.

Doktori projektem első célja az volt, hogy meghatározzuk a biofilmek hatását a candidaemiában szenvedő betegek körében tapasztalható mortalitásra, különös tekintettel a biofilmek tömegére és metabolikus aktivitására. Míg a második cél a farnesol potenciális gombaellenes és/vagy adjuváns hatásának vizsgálata volt a *C. auris* ellen. A farnesol *C. auris*-ra gyakorolt hatásának vizsgálatához növekedésre, a biofilmképző képességre, a triazolérzékenységre és a virulenciára összpontosító kísérleteket végeztünk.

A biofilmmel kapcsolatos epidemiológiai kísérletek alapján a közepes/magas biofilmtömeg szignifikánsan magasabb mortalitással (61%) járt együtt. A mortalitás szignifikánsan magasabb volt a közepes/magas metabolikus aktivitású biofilmet termelő *Candida* izolátumok által okozott fertőzésekben (62% vs. 33%, $p=0,01$), és ebben az esetben a biofilm közepes/magas metabolikus aktivitása a mortalitás független prediktora volt. A *C. auris*-szal kapcsolatos kísérletekben a farnesol kezelés koncentrációfüggő gátlást mutatott a biofilmképző képességet illetően. A 300 μM farnesol az egynapos biofilmekkel szemben jelentős metabolikus aktivitás csökkenést eredményezett 2 és 24 óra között ($p < 0,001$). Az azolok és a farnesol között szinergista kölcsönhatást tapasztaltunk (FICI 0,038 és 0,375 között) a biofilmek esetében. Immunszuppresszált egérmódelünkben a napi 75 μM farnesol kezelés szignifikánsan csökkentette a veséből kitenyészett élő gombasejtek számát ($p < 0,01$).

Összefoglalva, eredményeink egyértelmű bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a *Candida* biofilmek, különösen a közepes/magas metabolikus aktivitást mutatók kapcsolatba hozhatók a candidaemia-ban szenvedő betegek magasabb mortalitásával. Továbbá a farnesol ígéretes terápiás vagy adjuváns potenciált mutatott a *C. auris* ellen, ami jó kiindulópont lehet az alternatív *C. auris* ellenes terápiák megfogalmazásakor.

9. Summary

Candidaemia is a frequently observed life-threatening disease among hospitalized patients. Several newly emerged *Candida* species such as *Candida auris* contributes to worrisome mortality and epidemiology trend of candidaemia. The spreading of the potential multidrug-resistant *C. auris* is considered as a current threat. Biofilm formation is a virulence factor for several clinically relevant *Candida* species; however, the effect of the *Candida* biofilm-forming ability on the outcome remains controversial. The number of therapeutic regimens against biofilms and/or newly emerged *C. auris* planktonic cells and biofilms is limited; therefore, development of novel therapeutic approach is urgently needed. The first aim of my project was to determine the impact of biofilms, specifically focusing on biofilm mass and metabolic activity, on the mortality in candidaemia. While the second aim was to examine the potential antifungal and/or adjuvant effect of farnesol against *C. auris*. To examine the effect of farnesol on *C. auris*, we performed experiments focusing on growth, biofilm production ability, triazole susceptibility and virulence.

The biofilm-related epidemiological experiments revealed that intermediate/high biofilm mass was associated with significantly higher mortality (61%). The mortality was significantly higher in infections caused by *Candida* isolates producing biofilms with intermediate/high metabolic activity (62% vs. 33%, $p < 0.01$), and intermediate/high biofilm activity was an independent predictor of death. In *C. auris*-related experiments, farnesol treatment showed a concentration dependent inhibition regarding biofilm formation of *C. auris*; however, it did not inhibit significantly the biofilm development at 24 h. Moreover, 300 μM farnesol exerted a remarkable decrease in metabolic activity against biofilms between 2 and 24 h ($p < 0.001$). Synergistic interaction was observed between azoles and farnesol (FICI ranges from 0.038 to 0.375) against one-day-old biofilms. Seventy-five $\mu\text{M}/\text{day}$ farnesol treatment reduced the fungal burden in an immunocompromised murine model of disseminated candidiasis ($p < 0.01$). In summary, these results provide a clear evidence that *Candida* biofilms, especially with intermediate/high metabolic activity, are related to higher mortality in candidaemia. Furthermore, farnesol shows a promising therapeutic or adjuvant potential in traditional or alternative therapies against *C. auris*.

10. Irodalomjegyzék

1. **Al-Fattani MA**, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol.* 2006;55:999-1008.
2. **Albuquerque P**, Casadevall A. Quorum sensing in fungi--a review. *Med Mycol.* 2012;50:337-45.
3. **Allen D**, Wilson D, Drew R, Perfect J. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13:787-98.
4. **Almirante B**, Rodríguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, Alonso-Tarres C, Rodríguez-Tudela JL, Pahissa A. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1681-5.
5. **Almirante B**, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M, Saballs P, Fridkin SK, Morgan J, Rodríguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A; Barcelona Candidemia Project Study Group. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol.* 2005;43:1829-35.
6. **Andes D**, Diekema DJ, Pfaller MA, Bohrmuller J, Marchillo K, Lepak A. *In vivo* comparison of the pharmacodynamic targets for echinocandin drugs against *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:2497-506.
7. **Andes D**, Nett J, Oschel P, Albrecht R, Marchillo K, Pitula A. Development and characterization of an *in vivo* central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect Immun.* 2004;72:6023-31.
8. **Arendrup MC**, Prakash A, Meletiadis J, Sharma C, Chowdhary A. Comparison of EUCAST and CLSI Reference Microdilution MICs of Eight Antifungal Compounds for *Candida auris*

and Associated Tentative Epidemiological Cutoff Values. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61:e00485-17.

9. Arikan S, Rex JH. Lipid-based antifungal agents: current status. *Curr Pharm Des.* 2001;7:393-415.

10. Arora P, Singh P, Wang Y, Yadav A, Pawar K, Singh A, Padmavati G, Xu J, Chowdhary A. Environmental Isolation of *Candida auris* from the Coastal Wetlands of Andaman Islands, India. *mBio.* 2021;12:e03181-20.

11. Asmundsdottir LR, Erlendsdottir H, Gottfredsson M. Nationwide study of candidemia, antifungal use, and antifungal drug resistance in Iceland, 2000 to 2011. *J Clin Microbiol.* 2013;51:841-8.

12. Bidaud AL, Botterel F, Chowdhary A, Dannaoui E. *In vitro* antifungal combination of flucytosine with amphotericin B, voriconazole, or micafungin against *Candida auris* shows no antagonism. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63:e01393-19.

13. Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, Estivalet Svidzinski TI, Borsato Quesada RM, Goldenberg S, Krieger MA, Yamada-Ogatta SF. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res.* 2008;8:442-50.

14. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9:588-94.

15. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. *J Fungi (Basel).* 2017;3:57.

16. Borman AM, Szekely A, Johnson EM. Comparative Pathogenicity of United Kingdom Isolates of the Emerging Pathogen *Candida auris* and Other Key Pathogenic *Candida* Species. *mSphere.* 2016;1:e00189-16.

17. Borman AM, Szekely A, Johnson EM. Isolates of the emerging pathogen *Candida auris* present in the UK have several geographic origins. *Med Mycol.* 2017;55:563-67.

- 18. Bozó A**, Domán M, Majoros L, Kardos G, Varga I, Kovács R. The *in vitro* and *in vivo* efficacy of fluconazole in combination with farnesol against *Candida albicans* isolates using a murine vulvovaginitis model. *J Microbiol.* 2016;54:753-60.
- 19. Bringmann A**, Skatchkov SN, Faude F, Enzmann V, Reichenbach A. Farnesol modulates membrane currents in human retinal glial cells. *J Neurosci Res.* 2000;62:396-402.
- 20. Cao YY**, Cao YB, Xu Z, Ying K, Li Y, Xie Y, Zhu ZY, Chen WS, Jiang YY. cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:584-9.
- 21. Carvalho C**, Yang J, Vogan A, Maganti H, Yamamura D, Xu J. Clinical and tree hollow populations of human pathogenic yeast in Hamilton, Ontario, Canada are different. *Mycoses.* 2014;57:271-83.
- 22. Casadevall A**, Kontoyiannis DP, Robert V. On the Emergence of *Candida auris*: Climate Change, Azoles, Swamps, and Birds. *mBio.* 2019;10:e01397-19.
- 23. Centers for Disease Control and Prevention (CDC)**. National and state health-care associated infections progress report. Available at: <http://www.cdc.gov/HAI/pdfs/progress-report/hai-progress-report.pdf>. Accessed June 13, 2016.
- 24. Chandra J**, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 200;183:5385-94.
- 25. Chandra J**, Mukherjee PK. *Candida* Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. *Microbiol Spectr.* 2015;3:10.
- 26. Chandra J**, Patel JD, Li J, Zhou G, Mukherjee PK, McCormick TS, Anderson JM, Ghannoum MA. Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:8795-801.

- 27. Chatterjee S**, Alampalli SV, Nageshan RK, Chettiar ST, Joshi S, Tatu US. Draft genome of a commonly misdiagnosed multidrug resistant pathogen *Candida auris*. BMC Genomics. 2015;16:686.
- 28. Chowdhary A**, Anil Kumar V, Sharma C, Prakash A, Agarwal K, Babu R, Dinesh KR, Karim S, Singh SK, Hagen F, Meis JF. Multidrug-resistant endemic clonal strain of *Candida auris* in India. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014;33:919-26.
- 29. Clinical and Laboratory Standards Institute (2008)** Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved standard, 3rd ed. M27–A3. Wayne, PA: CLSI.
- 30. Cornely OA**, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg BJ, Lortholary O, Meersseman W, Akova M, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bille J, Castagnola E, Cuenca-Estrella M, Donnelly JP, Groll AH, Herbrecht R, Hope WW, Jensen HE, Lass-Flörl C, Petrikos G, Richardson MD, Roilides E, Verweij PE, Viscoli C, Ullmann AJ; ESCMID Fungal Infection Study Group. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. Clin Microbiol Infect. 2012;18:19-37.
- 31. Davis MR**, Donnelley MA, Thompson GR. Ibrexafungerp: A novel oral glucan synthase inhibitor. Med Mycol. 2020;58:579-92.
- 32. Day AM**, McNiff MM, da Silva Dantas A, Gow NAR, Quinn J. Hog1 Regulates Stress Tolerance and Virulence in the Emerging Fungal Pathogen *Candida auris*. mSphere. 2018 24;3:e00506-18.
- 33. de Barros PP**, Rossoni RD, de Souza CM, Scorzoni L, Fenley JC, Junqueira JC. *Candida* Biofilms: An Update on Developmental Mechanisms and Therapeutic Challenges. Mycopathologia. 2020;185:415-24.
- 34. De Las Peñas A**, Pan SJ, Castaño I, Alder J, Cregg R, Cormack BP. Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. Genes Dev. 2003;17:2245-58.

- 35. Demirci-Duarte S**, Arikan-Akdagli S, Gülmez D. Species distribution, azole resistance and related molecular mechanisms in invasive *Candida parapsilosis* complex isolates: Increase in fluconazole resistance in 21 years. *Mycoses*. 2021;64:823-30.
- 36. Dewaele K**, Frans J, Smismans A, Ho E, Tollens T, Lagrou K. First case of *Candida auris* infection in Belgium in a surgical patient from Kuwait. *Acta Clin Belg*. 2020;75:221-28.
- 37. Diaz PI**, Hong BY, Dupuy AK, Choquette L, Thompson A, Salner AL, Schauer PK, Hegde U, Burlison JA, Strausbaugh LD, Peterson DE, Dongari-Bagtzoglou A. Integrated Analysis of Clinical and Microbiome Risk Factors Associated with the Development of Oral Candidiasis during Cancer Chemotherapy. *J Fungi (Basel)*. 2019;5:49.
- 38. Diekema D**, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;73:45-8.
- 39. Diekema DJ**, Messer SA, Brueggemann AB, Coffman SL, Doern GV, Herwaldt LA, Pfaller MA. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J Clin Microbiol*. 2002;40:1298-302.
- 40. Donlan RM**. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis*. 2001;7:277-81.
- 41. Douglas LJ**. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 2003;11:30-6.
- 42. Dudeck MA**, Edwards JR, Allen-Bridson K, Gross C, Malpiedi PJ, Peterson KD, Pollock DA, Weiner LM, Sievert DM. National Healthcare Safety Network report, data summary for 2013, Device-associated Module. *Am J Infect Control*. 2015;43:206-21.
- 43. Estivill D**, Arias A, Torres-Lana A, Carrillo-Muñoz AJ, Arévalo MP. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *J Microbiol Methods*. 2011;86:238-42.

- 44. Fakhim H**, Chowdhary A, Prakash A, Vaezi A, Dannaoui E, Meis JF, Badali H. *In Vitro* Interactions of Echinocandins with Triazoles against Multidrug-Resistant *Candida auris*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61:e01056-17.
- 45. Fakhim H**, Vaezi A, Dannaoui E, Chowdhary A, Nasiry D, Faeli L, Meis JF, Badali H. Comparative virulence of *Candida auris* with *Candida haemulonii*, *Candida glabrata* and *Candida albicans* in a murine model. *Mycoses*. 2018;61:377-82.
- 46. Fernandes Costa A**, Evangelista Araujo D, Santos Cabral M, Teles Brito I, Borges de Menezes Leite L, Pereira M, Correa Amaral A. Development, characterization, and *in vitro-in vivo* evaluation of polymeric nanoparticles containing miconazole and farnesol for treatment of vulvovaginal candidiasis. *Med Mycol*. 2019;57:52-62.
- 47. Flemming HC**, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:623-33.
- 48. Funari SS**, Prades J, Escribá PV, Barceló F. Farnesol and geranylgeraniol modulate the structural properties of phosphatidylethanolamine model membranes. *Mol Membr Biol*. 2005;22:303-11.
- 49. Gallis HA**, Drew RH, Pickard WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis*. 1990;12:308-29.
- 50. Graham CE**, Cruz MR, Garsin DA, Lorenz MC *Enterococcus faecalis* bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114:4507-512.
- 51. Hajjeh RA**, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, Phelan M, Morgan J, Lee-Yang W, Ciblak MA, Benjamin LE, Sanza LT, Huie S, Yeo SF, Brandt ME, Warnock DW. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol*. 2004;42:1519-27.
- 52. Hamill RJ**. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs*. 2013;73:919-34.

- 53. Hata DJ**, Humphries R, Lockhart SR; College of American Pathologists Microbiology Committee. *Candida auris*: An Emerging Yeast Pathogen Posing Distinct Challenges for Laboratory Diagnostics, Treatment, and Infection Prevention. *Arch Pathol Lab Med*. 2020;144:107-14.
- 54. Hawksworth DL**, Lücking R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol Spectr*. 2017;5.
- 55. Hawser S**. Comparisons of the susceptibilities of planktonic and adherent *Candida albicans* to antifungal agents: a modified XTT tetrazolium assay using synchronised *C albicans* cells. *J Med Vet Mycol*. 1996;34:149-52.
- 56. Hawser SP**, Douglas LJ. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:2128-31.
- 57. Herrera-Guerra AS**, Garza-González E, Martínez-Resendez MF, Llaca-Díaz JM, Camacho-Ortiz A. Individual versus pooled multiple-lumen blood cultures for the diagnosis of intravascular catheter-related infections. *Am J Infect Control*. 2015;43:715-8.
- 58. Hickman MA**, Zeng G, Forche A, Hiraikawa MP, Abbey D, Harrison BD, Wang YM, Su CH, Bennett RJ, Wang Y, Berman J. The 'obligate diploid' *Candida albicans* forms mating-competent haploids. *Nature*. 2013;494:55-9.
- 59. Hisajima T**, Maruyama N, Tanabe Y, Ishibashi H, Yamada T, Makimura K, Nishiyama Y, Funakoshi K, Oshima H, Abe S. Protective effects of farnesol against oral candidiasis in mice. *Microbiol Immunol*. 2008;52:327-33.
- 60. Hornby JM**, Jensen EC, Lisek AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, Dussault P, Nickerson KW. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:2982-92.

- 61. Hornby JM**, Kebaara BW, Nickerson KW. Farnesol biosynthesis in *Candida albicans*: cellular response to sterol inhibition by zaragozic acid B. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:2366-9.
- 62. Huang G**. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Virulence*. 2012;3:251-61.
- 63. Jabra-Rizk MA**, Shirliff M, James C, Meiller T. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance. *FEMS Yeast Res*. 2006;6:1063-73.
- 64. Jahanshiri Z**, Manifar S, Moosa H, Asghari-Paskiabi F, Mahmoodzadeh H, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients in Iran: Species identification, antifungal susceptibility and pathogenic characterization. *J Mycol Med*. 2018;28:361-66.
- 65. Jakab Á**, Tóth Z, Nagy F, Nemes D, Bácskay I, Kardos G, Emri T, Pócsi I, Majoros L, Kovács R. Physiological and Transcriptional Responses of *Candida parapsilosis* to Exogenous Tyrosol. *Appl Environ Microbiol*. 2019;85:e01388-19.
- 66. Jeffery-Smith A**, Taori SK, Schelenz S, Jeffery K, Johnson EM, Borman A; *Candida auris* Incident Management Team, Manuel R, Brown CS. *Candida auris*: a Review of the Literature. *Clin Microbiol Rev*. 2017;31:e00029-17.
- 67. Katragkou A**, McCarthy M, Alexander EL, Antachopoulos C, Meletiadis J, Jabra-Rizk MA, Petraitis V, Roilides E, Walsh TJ. *In vitro* interactions between farnesol and fluconazole, amphotericin B or micafungin against *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70:470-8.
- 68. Kean R**, Delaney C, Sherry L, Borman A, Johnson EM, Richardson MD, Rautema-Richardson R, Williams C, Ramage G. Transcriptome Assembly and Profiling of *Candida auris* Reveals Novel Insights into Biofilm-Mediated Resistance. *mSphere*. 2018;3:e00334-18.
- 69. Kean R**, Ramage G. Combined Antifungal Resistance and Biofilm Tolerance: the Global Threat of *Candida auris*. *mSphere*. 2019;4:e00458-19.

- 70. Keighley C**, Chen SC, Marriott D, Pope A, Chapman B, Kennedy K, Bak N, Underwood N, Wilson HL, McDonald K, Darvall J, Halliday C, Kidd S, Nguyen Q, Hajkowitz K, Sorrell TC, Van Hal S, Slavin MA. Candidaemia and a risk predictive model for overall mortality: a prospective multicentre study. *BMC Infect Dis.* 2019;19:445.
- 71. Kim JH**, Suh JW, Kim MJ. Epidemiological Trends of Candidemia and the Impact of Adherence to the Candidemia Guideline: Six-Year Single-Center Experience. *J Fungi (Basel).* 2021;7:275.
- 72. Koehler P**, Stecher M, Cornely OA, Koehler D, Vehreschild MJGT, Bohlius J, Wisplinghoff H, Vehreschild JJ. Morbidity and mortality of candidaemia in Europe: an epidemiologic meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25:1200-12.
- 73. Komor U**, Bielecki P, Loessner H, Rohde M, Wolf K, Westphal K, Weiss S, Häussler S. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* in solid murine tumors - a novel model system. *Microbes Infect.* 2012;14:951-8.
- 74. Kontoyiannis DP**. Antifungal Resistance: An Emerging Reality and A Global Challenge. *J Infect Dis.* 2017;216:S431-S435.
- 75. 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.* 2016;47:304-10.
- 76. 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;63:186-94.
- 77. Kovács R**, Holzknacht J, Hargitai Z, Papp C, Farkas A, Borics A, Tóth L, Váradi G, Tóth GK, Kovács I, Dubrac S, Majoros L, Marx F, Galgóczy L. *In Vivo* Applicability of Neosartorya fischeri Antifungal Protein 2 (NFAP2) in Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63:e01777-18.

- 78. Kovács R**, Majoros L. Fungal Quorum-Sensing Molecules: A Review of Their Antifungal Effect against *Candida* Biofilms. *J Fungi (Basel)*. 2020;6:99.
- 79. 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;46:1773-80.
- 80. Langford ML**, Hasim S, Nickerson KW, Atkin AL. Activity and toxicity of farnesol towards *Candida albicans* are dependent on growth conditions. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:940-2.
- 81. Lattif AA**, Mukherjee PK, Chandra J, Swindell K, Lockhart SR, Diekema DJ, Pfaller MA, Ghannoum MA. Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. *Int J Med Microbiol*. 2010;300:265-70.
- 82. Lee WG**, Shin JH, Uh Y, Kang MG, Kim SH, Park KH, Jang HC. First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*. *J Clin Microbiol*. 2011 Sep;49(9):3139-42.
- Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5:48-56.
- 83. Li RK**, Ciblak MA, Nordoff N, Pasarell L, Warnock DW, McGinnis MR. In vitro activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, and *Histoplasma capsulatum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:1734-6.
- 84. Lockhart SR**, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP, Colombo AL, Calvo B, Cuomo CA, Desjardins CA, Berkow EL, Castanheira M, Magobo RE, Jabeen K, Asghar RJ, Meis JF, Jackson B, Chiller T, Litvintseva AP. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. *Clin Infect Dis*. 2017;64:134-40.
- 85. Lovero G**, Borghi E, Balbino S, Cirasola D, De Giglio O, Perdoni F, Caggiano G, Morace G, Montagna MT. Molecular Identification and Echinocandin Susceptibility of *Candida parapsilosis* Complex Bloodstream Isolates in Italy, 2007-2014. *PLoS One*. 2016;11:e0150218.

- 86. Magill SS**, Swoboda SM, Shields CE, Colantuoni EA, Fothergill AW, Merz WG, Lipsett PA, Hendrix CW. The epidemiology of *Candida* colonization and invasive candidiasis in a surgical intensive care unit where fluconazole prophylaxis is utilized: follow-up to a randomized clinical trial. *Ann Surg.* 2009;249:657-65.
- 87. Maki DG**, Weise CE, Sarafin HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med.* 1977;296:1305-9.
- 88. Marcos-Zambrano LJ**, Escribano P, Bouza E, Guinea J. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. *Int J Med Microbiol.* 2014;304:1192-8.
- 89. Martin-Loeches I**, Antonelli M, Cuenca-Estrella M, Dimopoulos G, Einav S, De Waele JJ, Garnacho-Montero J, Kanj SS, Machado FR, Montravers P, Sakr Y, Sanguinetti M, Timsit JF, Bassetti M. ESICM/ESCMID task force on practical management of invasive candidiasis in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2019;45:789-805.
- 90. McGinnis MR**, Nordoff N, Li RK, Pasarell L, Warnock DW. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. *Med Mycol.* 2001;39:369-71.
- 91. Mehmood A**, Liu G, Wang X, Meng G, Wang C, Liu Y. Fungal Quorum-Sensing Molecules and Inhibitors with Potential Antifungal Activity: A Review. *Molecules.* 2019;24:1950.
- 92. Meletiadis J**, Pournaras S, Roilides E, Walsh TJ. Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, Monte Carlo simulation analysis, and *in vitro-in vivo* correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:602-9.
- 93. Meletiadis J**, Verweij PE, TeDorsthorst DT, Meis JF, Mouton JW. Assessing *in vitro* combinations of antifungal drugs against yeasts and filamentous fungi: comparison of different drug interaction models. *Med Mycol.* 2005;43:133-52.

- 94. Mermel LA**, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O'Grady NP, Raad II, Rijnders BJ, Sherertz RJ, Warren DK. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;49:1-45.
- 95. Mirhendi H**, Bruun B, Schønheyder HC, Christensen JJ, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, Johansen HK, Nielsen L, Knudsen JD, Arendrup MC. Differentiation of *Candida glabrata*, *C. nivariensis* and *C. bracarensis* based on fragment length polymorphism of ITS1 and ITS2 and restriction fragment length polymorphism of ITS and D1/D2 regions in rDNA. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30:1409-16.
- 96. Mitchell KF**, Zarnowski R, Andes DR. The Extracellular Matrix of Fungal Biofilms. *Adv Exp Med Biol*. 2016;931:21-35.
- 97. Mitchell KF**, Zarnowski R, Sanchez H, Edward JA, Reinicke EL, Nett JE, Mitchell AP, Andes DR. Community participation in biofilm matrix assembly and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:4092-7.
- 98. Modrzewska B**, Kurnatowski P. Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. *Ann Parasitol*. 2015;61:3-9.
- 99. Morales DK**, Grahl N, Okegbe C, Dietrich LE, Jacobs NJ, Hogan DA. Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *MBio*. 2013;4:e00526-e612.
- 100. Muñoz JF**, Gade L, Chow NA, Loparev VN, Juieng P, Berkow EL, Farrer RA, Litvintseva AP, Cuomo CA. Genomic insights into multidrug-resistance, mating and virulence in *Candida auris* and related emerging species. *Nat Commun*. 2018;9:5346.
- 101. Muñoz P**, Agnelli C, Guinea J, Vena A, Álvarez-Uría A, Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Valerio M, Bouza E. Is biofilm production a prognostic marker in adults with candidaemia? *Clin Microbiol Infect*. 2018;24:1010-5.

- 102. Nagy F, Tóth Z, Daróczy L, Székely A, Borman AM, Majoros L, Kovács R.** Farnesol increases the activity of echinocandins against *Candida auris* biofilms. *Med Mycol.* 2020;58:404-7.
- 103. Navarathna DH, Hornby JM, Hoerrmann N, Parkhurst AM, Duhamel GE, Nickerson KW.** Enhanced pathogenicity of *Candida albicans* pre-treated with subinhibitory concentrations of fluconazole in a mouse model of disseminated candidiasis. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56:1156-9.
- 104. Navarathna DH, Hornby JM, Krishnan N, Parkhurst A, Duhamel GE, Nickerson KW.** Effect of farnesol on a mouse model of systemic candidiasis, determined by use of a DPP3 knockout mutant of *Candida albicans*. *Infect Immun.* 2007;75:1609-18.
- 105. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, VanHandel M, Andes D.** Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:510-20.
- 106. Nett JE, Andes DR.** Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30:51-83.
- 107. Nield B, Larsen SR, van Hal SJ.** Clinical experience with new formulation SUBA®-itraconazole for prophylaxis in patients undergoing stem cell transplantation or treatment for haematological malignancies. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74:3049-55.
- 108. Nishii M, Soutome S, Kawakita A, Yutori H, Iwata E, Akashi M, Hasegawa T, Kojima Y, Funahara M, Umeda M, Komori T.** Factors associated with severe oral mucositis and candidiasis in patients undergoing radiotherapy for oral and oropharyngeal carcinomas: a retrospective multicenter study of 326 patients. *Support Care Cancer.* 2020;28:1069-75.
- 109. Nobile CJ, Andes DR, Nett JE, Smith FJ, Yue F, Phan QT, Edwards JE, Filler SG, Mitchell AP.** Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *PLoS Pathog.* 2006;2:e63.

- 110. Nobile CJ**, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD, Tuch BB, Andes DR, Johnson AD. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell*. 2012;148:126-38.
- 111. O'Toole GA**. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp*. 2011;1-2.
- 112. Oh BJ**, Shin JH, Kim MN, Sung H, Lee K, Joo MY, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Biofilm formation and genotyping of *Candida haemulonii*, *Candida pseudohaemulonii*, and a proposed new species (*Candida auris*) isolates from Korea. *Med Mycol*. 2011;49:98-102.
- 113. Pathirana RU**, Friedman J, Norris HL, Salvatori O, McCall AD, Kay J, Edgerton M. Fluconazole-Resistant *Candida auris* Is Susceptible to Salivary Histatin 5 Killing and to Intrinsic Host Defenses. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62:e01872-17.
- 114. Pawar V**, Crull K, Komor U, Kasnitz N, Frahm M, Kocijancic D, Westphal K, Leschner S, Wolf K, Loessner H, Rohde M, Häussler S, Weiss S. Murine solid tumours as a novel model to study bacterial biofilm formation *in vivo*. *J Intern Med*. 2014;276:130-9.
- 115. Pfaller MA**, Carvalhaes C, Messer SA, Rhomberg PR, Castanheira M. Activity of a Long-Acting Echinocandin, Rezafungin, and Comparator Antifungal Agents Tested against Contemporary Invasive Fungal Isolates (SENTRY Program, 2016 to 2018). *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64:e00099-20.
- 116. Pfaller MA**, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:561-6.
- 117. Pierce CG**, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL Jr, Mowat E, Ramage G, Lopez-Ribot JL. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc*. 2008;3:1494-500.

- 118. Piqueras AI**, Rubio T, Lopez-Medina EM, Gimeno A, Modesto V, Cantón E, Pemán J. Recent changes in candidemia trends in a tertiary hospital (2011-2018). *Rev Iberoam Micol.* 2020;37:87-93.
- 119. Pongrácz J**, Benedek K, Juhász E, Iván M, Kristóf K. *In vitro* biofilm production of *Candida* bloodstream isolates: any association with clinical characteristics? *J Med Microbiol.* 2016;65:272-7.
- 120. Pupim ACE**, Campois TG, Araújo EJA, Svidizinski TIE, Felipe I. Infection and tissue repair of experimental cutaneous candidiasis in diabetic mice. *J Med Microbiol.* 2017 ;66:808-15.
- 121. Quindós G**. Candidemias y candidiasis invasivas nosocomiales [Nosocomial candidemias and invasive candidiasis]. *Med Clin (Barc).* 2010;134:17-9.
- 122. Raad I**, Hanna HA, Alakech B, Chatzinikolaou I, Johnson MM, Tarrand J. Differential time to positivity: a useful method for diagnosing catheter-related bloodstream infections. *Ann Intern Med.* 2004;140:18-25.
- 123. Rajendran R**, Sherry L, Nile CJ, Sherriff A, Johnson EM, Hanson MF, Williams C, Munro CA, Jones BJ, Ramage G. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection-Scotland, 2012-2013. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22:87-93.
- 124. Ramage G**, Saville SP, Wickes BL, López-Ribot JL. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol.* 2002 ;68:5459-63.
- 125. Ramage G**, VandeWalle K, López-Ribot JL, Wickes BL. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;214:95-100.

- 126. Ramage G.** Comparing apples and oranges: considerations for quantifying candidal biofilms with XTT [2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide] and the need for standardized testing. *J Med Microbiol.* 2016;65:259-60.
- 127. Risum M,** Astvad K, Johansen HK, Schønheyder HC, Rosenvinge F, Knudsen JD, Hare RK, Datcu R, Røder BL, Antsupova VS, Kristensen L, Gertsen JB, Møller JK, Dzajic E, Søndergaard TS, Arendrup MC. Update 2016-2018 of the Nationwide Danish Fungaemia Surveillance Study: Epidemiologic Changes in a 15-Year Perspective. *J Fungi (Basel).* 2021;7:491.
- 128. Roemer T,** Krysan DJ. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4:a019703.
- 129. Rosenthal VD.** Central line-associated bloodstream infections in limited-resource countries: a review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2009;49:1899-907.
- 130. Rossignol T,** Logue ME, Reynolds K, Grenon M, Lowndes NF, Butler G. Transcriptional response of *Candida parapsilosis* following exposure to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:2304-12.
- 131. Rupp ME,** Karnatak R. Intravascular Catheter-Related Bloodstream Infections. *Infect Dis Clin North Am.* 2018;32:765-87.
- 132. Sabatelli F,** Patel R, Mann PA, Mendrick CA, Norris CC, Hare R, Loebenberg D, Black TA, McNicholas PM. *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:2009-15.
- 133. Safdar N,** Fine JP, Maki DG. Meta-analysis: methods for diagnosing intravascular device-related bloodstream infection. *Ann Intern Med.* 2005;142:451-66.
- 134. Santos MA,** Gomes AC, Santos MC, Carreto LC, Moura GR. The genetic code of the fungal CTG clade. *C R Biol.* 2011;334:607-11.

- 135. Satoh K**, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol Immunol.* 2009;53:41-4.
- 136. Schelenz S**, Hagen F, Rhodes JL, Abdolrasouli A, Chowdhary A, Hall A, Ryan L, Shackleton J, Trimlett R, Meis JF, Armstrong-James D, Fisher MC. First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2016;5:35.
- 137. Scheper MA**, Shirliff ME, Meiller TF, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Farnesol, a fungal quorum-sensing molecule triggers apoptosis in human oral squamous carcinoma cells. *Neoplasia.* 2008;10:954-63.
- 138. Schwab F**, Geffers C, Behnke M, Gastmeier P. ICU mortality following ICU-acquired primary bloodstream infections according to the type of pathogen: A prospective cohort study in 937 Germany ICUs (2006–2015). *PLoS ONE.* 2018;13:e0194210.
- 139. Scorzoni L**, de Paula E Silva AC, Marcos CM, Assato PA, de Melo WC, de Oliveira HC, Costa-Orlandi CB, Mendes-Giannini MJ, Fusco-Almeida AM. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Front Microbiol.* 2017;8:36.
- 140. Seiler GT**, Ostrosky-Zeichner L. Investigational Agents for the Treatment of Resistant Yeasts and Molds. *Curr Fungal Infect Rep.* 2021:1-12.
- 141. Seneviratne CJ**, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis.* 2008;14:582-90.
- 142. Shin JH**, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK, Suh SP, Ryang DW. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1244-8.
- 143. Silva S**, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol.* 2009;47:681-9.

- 144. Silva S**, Rodrigues CF, Araújo D, Rodrigues ME, Henriques M. *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. *J Fungi (Basel)*. 2017;3:8.
- 145. Sims CR**, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH. Invasive candidiasis in immunocompromised hospitalized patients. *Arch Med Res*. 2005;36:660-71.
- 146. Singh R**, Kaur M, Chakrabarti A, Shankarnarayan SA, Rudramurthy SM. Biofilm formation by *Candida auris* isolated from colonising sites and candidemia cases. *Mycoses*. 2019;62:706-9.
- 147. Song JW**, Shin JH, Kee SJ, Kim SH, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Expression of CgCDR1, CgCDR2, and CgERG11 in *Candida glabrata* biofilms formed by bloodstream isolates. *Med Mycol*. 2009;47:545-8.
- 148. Spivak ES**, Hanson KE. *Candida auris*: an Emerging Fungal Pathogen. *J Clin Microbiol*. 2018;56:e01588-17.
- 149. Susewind S**, Lang R, Hahnel S. Biofilm formation and *Candida albicans* morphology on the surface of denture base materials. *Mycoses*. 2015;58:719-27.
- 150. Tang CQ**, Li JQ, Shou BM, Pan BH, Chen TS, Xiao YQ, Zheng XP, Xiao SC, Tan Q, Xia ZF. Epidemiology and outcomes of bloodstream infections in 177 severe burn patients from an industrial disaster: a multicentre retrospective study. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24:199.e1-199.e7.
- 151. Taori SK**, Khonyongwa K, Hayden I, Athukorala GDA, Letters A, Fife A, Desai N, Borman AM. *Candida auris* outbreak: Mortality, interventions and cost of sustaining control. *J Infect*. 2019;79:601-11.
- 152. Thompson GR 3rd**, Cadena J, Patterson TF. Overview of antifungal agents. *Clin Chest Med*. 2009;30:203-15
- 153. Tortorano AM**, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27:359-66

- 154. Verstrepen KJ**, Klis FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol.* 2006;60:5-15.
- 155. Wang X**, Bing J, Zheng Q, Zhang F, Liu J, Yue H, Tao L, Du H, Wang Y, Wang H, Huang G. The first isolate of *Candida auris* in China: clinical and biological aspects. *Emerg Microbes Infect.* 2018;7:93.
- 156. Weber K**, Schulz B, Ruhnke M. The quorum-sensing molecule E,E-farnesol--its variable secretion and its impact on the growth and metabolism of *Candida* species. *Yeast.* 2010;27:727-39.
- 157. Weber K**, Sohr R, Schulz B, Fleischhacker M, Ruhnke M. Secretion of E,E-farnesol and biofilm formation in eight different *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1859-61.
- 158. Welsh RM**, Bentz ML, Shams A, Houston H, Lyons A, Rose LJ, Litvintseva AP. Survival, Persistence, and Isolation of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogenic Yeast *Candida auris* on a Plastic Health Care Surface. *J Clin Microbiol.* 2017;55:2996-3005.
- 159. Wenzel RP**, Edmond MB. The impact of hospital-acquired bloodstream infections. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:174-7.
- 160. Wenzel RP**, Gennings C. Bloodstream infections due to *Candida* species in the intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. *Clin Infect Dis.* 2005;41:S389-93.
- 161. Whiteway M**, Bachewich C. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol.* 2007;61:529-53.
- 162. Wiederhold NP**. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infect Drug Resist.* 2017;10:249-59.

- 163. 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.
- 164. Yu LH**, Wei X, Ma M, Chen XJ, Xu SB. Possible inhibitory molecular mechanism of farnesol on the development of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:770-5.
- 165. Yue H**, Bing J, Zheng Q, Zhang Y, Hu T, Du H, Wang H, Huang G. Filamentation in *Candida auris*, an emerging fungal pathogen of humans: passage through the mammalian body induces a heritable phenotypic switch. *Emerg Microbes Infect*. 2018;7:188.
- 166. Zarnowski R**, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM, Bothe JR, Bernhardt J, Lounes-Hadj Saharaoui A, Fontaine J, Sanchez H, Hatfield RD, Ntambi JM, Nett JE, Mitchell AP, Andes DR. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *mBio*. 2014;5:e01333-14.
- 167. Zimlichman E**, Henderson D, Tamir O, Franz C, Song P, Yamin CK, Keohane C, Denham CR, Bates DW. Health care-associated infections: a meta-analysis of costs and financial impact on the US health care system. *JAMA Intern Med*. 2013;173:2039-46.



Nyilvántartási szám: DEENK/435/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Vitális Eszter

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Vitális, E.**, Nagy, F., Tóth, Z., Forgács, L., Bozó, A., Kardos, G., Majoros, L., Kovács, R. L.:
Candida biofilm production is associated with higher mortality in patients with candidaemia.
Mycoses. 63 (4), 352-360, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/myc.13049>
IF: 4.377
2. Nagy, F., **Vitális, E.**, Jakab, Á., Borman, A. M., Forgács, L., Tóth, Z., Majoros, L., Kovács, R. L.: In vitro and in vivo effect of exogenous farnesol exposure against *Candida auris*.
Front. Microbiol. 11, 1-12, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00957>
IF: 5.64

További közlemények

3. Nagy, G. G., Tudlik, Z., Gergely, L., Kónya, J., Orosi, P., Rákóczi, É., Szabó, J., Várvölgyi, C., **Vitális, E.**, Paragh, G.: A székletmikrobiota-transzplantáció technológiájának és minőségirányítási hátterének újragondolása a SARS-CoV-2 víruspandémia kapcsán.
Orv. hetil. 161 (44), 1858-1871, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2020.32023>
IF: 0.54
4. Velkey, B., **Vitális, E.**, Vitális, Z.: Spontán bakteriális peritonitis.
Orv. hetil. 158 (2), 50-57, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2017.30637>
IF: 0.322
5. **Vitális, E.**: Perioperatív antibiotikum-profilaxis.
In: Perioperatív betegellátás. Szerk.: Tassonyi Edömér, Fülecsi Béla, Molnár Csilla, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 350-356, 2016.





6. Nemes, B. Á., Gellyey, F., Dabasi, E., Gámán, G., Fehérvári, I., Görög, D., Kóbori, L., Fazakas, J.,
Vitális, E., Doros, A., Gálffy, Z., Máthé, Z.: Bakteriális infekciók májátültetés után.
Orvosi Hetilap. 156 (34), 1366-1382, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2015.30204>
IF: 0.291
7. Fazakas, B., Mohácsi, A., Gyöngyösi, Z., **Vitális, E.**, Simon, É., Molnár, C., Fülesdi, B.: A
maghőmérséklet transoesophagealis mérésének megbízhatósága félig zárt és zárt narkózis
rendszerrel végzett anesztéziák során.
Anaesthesiol. Intenziv Ther. 38 (3), 121-126, 2008.
8. Molnár, C., Kovács, Z., Tankó, B., Fülep, Z., **Vitális, E.**, Sárkány, P., Fülesdi, B.: Különböző elven
működő anesztézia mélység mérő monitorok klinikai alkalmazásának összehasonlítása
idegsebészeti beavatkozások során = Comparison of two different indices used in
anaesthesia depth monitors during neurosurgical operations.
Anaesthesiol. Intenziv Ther. 37 (3), 115-120, 2007.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 11,17

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,017**

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, 2021.09.09.



11. Tárgyszavak-Keywords

biofilm, quorum-sensing, farnesol, *C. auris*, azolok, szinergizmus, candidaemia, mortalitás

biofilms, quorum-sensing, farnesol, *C. auris*, azoles, synergy, candidaemia, mortality

12. Köszönetnyilvánítás

E munka elkészültéhez nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért elsősorban témavezetőmnek, Dr. Kovács Renátónak tartozom köszönettel, aki mindvégig támogatott, és tanácsaival, szakmai információk nyújtásával irányította munkámat, valamint rutinjával megkönnyítette a bürokratikus tennivalók intézését. Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Kónya Józsefnek és Dr. Majoros Lászlónak, hogy az Orvosi Mikrobiológiai Intézetben, valamint a mikológia laborban végezhettem PhD munkámat.

Szintén első helyen illeti köszönet Dr. Nagy Fruzsínát, aki a laboratóriumi munkákba vezetett be, kivitelezésük során mindvégig támaszom és segítőm volt, türelmesen kísért végig a kezdeti, legnehezebb időkben is.

Ezen kívül köszönöm a segítséget Dr. Kardos Gábornak a statisztikai vizsgálatok terén nyújtott pótolhatatlan segítségéért, és Forgács Lajosnak az *in vivo* kísérletek technikai kivitelezése során nyújtott segítségéért.

Köszönet továbbá a Debreceni Egyetem Klinikai Központ (DE KK) Orvosi Mikrobiológiai Intézet valamennyi munkatársának, amiért klinikus létemre közösségükbe fogadtak, és segítették a munkámat.

A mikrobiológusokon kívül köszönet illeti a DE KK Infektológia Klinika és a Kórházhygiénés Osztály dolgozóit és közvetlen infektológus kollegáimat, akik támogató hozzáállásukkal tették lehetővé, hogy megfelelően sok időt szentelhessek a kísérletek elvégzésének, a disszertáció megírásának.

Köszönettel tartozom előző témavezetőmnek, Prof. Dr. Fülesdi Bélának, aki a komplex vizsgáig segítette munkámat.

A candidaemiák iránti elköteleződésemet a budapesti Szent László Kórházban eltöltött szakmai gyakorlatom során Dr. Sinkó János alapozta meg, aki azóta is rengeteg segítséget nyújt klinikai kérdésekben.

Végül, de nem utolsó sorban köszönetet mondok férjemnek és gyermekeimnek, akik türelemmel viselték a prioritások időnkénti átrendeződését; férjemnek és szüleimnek, akik sokszor orozslánrészt vállaltak a gyermekek felügyeletéből, hogy én a munkámra koncentrálhassak, és édesapámnak, aki egész lényével, életével már kisgyermek koromban belém oltotta a tudományos kíváncsiságot, az eredmények kritikus értékelésének igényét és a mikrobiológia szeretetét.

És köszönet az egereknek, akik életüket áldozták a tudomány oltárán.

Az itt felsoroltak nélkül ez a munka sohasem készülhetett volna el.

13. Fűggelék