

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

***Candida auris* izolátumok *in vivo* virulenciájának és az  
amfotericin B kezelés hatékonyságának vizsgálata  
neutropéniás egérmodellben**

**Forgács Lajos**

**Témavezető: Prof. Dr. Majoros László**



**DEBRECENI EGYETEM**

**GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2025**

# Tartalom

1. Rövidítések jegyzéke .....	2
2. Bevezetés .....	3
3. Irodalmi áttekintés .....	5
3.1. A <i>Candida auris</i> fertőzések epidemiológiája .....	5
3.2. A <i>Candida auris</i> virulencia faktorai .....	6
3.3. Antifungális szerek invazív <i>Candida</i> fertőzések kezelésére.....	8
3.3.1. Amfotericin B .....	8
3.3.2. Triazol típusú antifungális szerek .....	10
3.3.3. Echinocandinok.....	12
3.4. Invazív gomba fertőzések hisztopatológiai vizsgálata.....	13
4. Célkitűzések.....	16
5. Anyagok és módszerek .....	17
5.1. A <i>Candida auris</i> izolátumok eredete .....	17
5.3. A kísérletben felhasznált egerek immunszuppresszációja .....	18
5.4. A fertőzés menete .....	18
5.5. Amfotericin B kezelés.....	19
5.6. Letalitási kísérlet.....	19
5.7. Szervtenyésztés .....	20
5.8. Szövetteni vizsgálat .....	20
5.9. Vizelettenyésztés.....	20
5.10. Statisztikai elemzés.....	21
6. Eredmények .....	22
6.1. <i>Candida auris</i> és <i>Candida albicans</i> virulenciájának összehasonlító vizsgálata neutropeniás egérmodellben .....	22
6.1.1. <i>Candida auris</i> kládok és <i>Candida albicans</i> virulenciája a letalítás alapján ...	22
6.1.2. <i>Candida auris</i> kládok és <i>Candida albicans</i> virulenciája a szöveti perzisztencia alapján.....	24
6.1.3. <i>Candida auris</i> kládok virulenciája a szív, a vesék, a máj, és a lép szövetteni vizsgálata alapján.....	27
6.1.4. <i>Candida albicans</i> virulenciája a szív, a vesék, a máj, és a lép szövetteni vizsgálata alapján.....	28
6.2. Amfotericin B <i>in vivo</i> hatékonysága <i>Candida auris</i> ellen.....	31
6.2.1. Amfotericin B <i>in vivo</i> hatékonysága a letalítás alapján.....	31
6.2.2. Amfotericin B <i>in vivo</i> hatékonysága a szervi perzisztencia alapján.....	33
6.2.3. Amfotericin B <i>in vivo</i> hatékonysága a szövetteni vizsgálatok alapján.....	35
6.2.4. Amfotericin B <i>in vivo</i> hatékonysága a vizelettenyésztés alapján.....	39
7. Megbeszélés.....	40
7.1. <i>Candida auris</i> és <i>Candida albicans</i> virulenciájának összehasonlító vizsgálata neutropeniás egérmodellben .....	40
7.2. Amfotericin B <i>in vivo</i> hatékonysága <i>Candida auris</i> ellen.....	43
8. Összefoglalás .....	48
9. Summary.....	49
10. Irodalomjegyzék .....	50
11. Tárgyszavak-Keywords .....	63
12. Köszönetnyilvánítás.....	67
13. Függelék.....	68

## 1. Rövidítések jegyzéke

AMB	Amfotericin B
ANF	Anidulafungin
CAS	Kaszpofungin
CFU	Kolónia képző egység (Colony forming unit)
FLU	Flukonazol
GMS	Gömöri-Grocott ezüstmeténamin reakció
ISA	Isavukonazol
ITR	Itrakonazol
MCF	Mikafungin
PAS	Perjódsav-Schiff reakció
POSA	Posakonazol
PTAH	Foszforwolframsavas-hematoxin
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute médium
RZF	Rezafungin
VOR	Vorikonazol

## 2. Bevezetés

A *Candida auris* egy multidrog-rezisztens, oportunista kórokozó, amit első ízben 2009-ben azonosítottak Japánban (Satoh és mtsai. 2009). A 2010-es évek közepére több kontinensen jegyezték a gombafaj által okozott kórházi járványokat, globális terjedésének köszönhetően pedig az évtized végére, az Antarktisz kivételével, minden kontinensen izolálták különböző törzseit (Sekyere és mtsai. 2018). A teljes genom szekvenálás alapján a *C. auris* izolátumokat hat filogenetikailag elkülönülő kládba osztották (dél-ázsiai, kelet-ázsiai, dél-afrikai, dél-amerikai, iráni és az újonnan felfedezett szingapúri). Összevetésben egymással, ezek a kládok virulenciájukban, fenotípusos jellemzőikben és antifungális szer érzékenységükben jelentős különbségeket mutatnak (Lockhart és mtsai. 2016; Szekely és mtsai. 2019; Borman és mtsai. 2016; Suphavitai és mtsai. 2024).

A *C. auris* nemcsak a multidrog-rezisztenciája miatt jelent terápiai kihívást, hanem azért is, mert a magas kockázatú betegek, különösen az alap- és kísérőbetegségekben szenvedők körében gyakran okoz fertőzéseket (diabetes mellitusban, kardiovaszkuláris betegségekben, immunszuppresszióban, hematológiai malignitásokban és 2019-es koronavírusos betegségben szenvedő betegeknél) (Armstrong és mtsai. 2016; Rudramurthy és mtsai. 2017; Chowdhary és mtsai. 2020). A *Centers for Disease Control and Prevention* adataiból kiderült, hogy az USA-ban vizsgált *C. auris* izolátumok 90%-a flukonazol, 30%-a amfotericin B és <0,5%-a echinocandin rezisztens volt (<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/cauris-antifungal.html>).

Korábbi tanulmányainkban összehasonlítottuk a négy fő kládba (dél-ázsiai, kelet-ázsiai, dél-afrikai és dél-amerikai) tartozó *C. auris* izolátumok antifungális szerek iránti *in vitro* érzékenységét (Papp és mtsai. 2021; Kovács és mtsai. 2021). Az anidulafungin, a kaszporfungin, a mikafungin és a rezafungin fungisztatikus hatású volt a négy kláddal szemben az idő-ölés vizsgálatokban RPMI-1640-ben vagy 50%-os szérumban (Kovács és mtsai. 2021). Az amfotericin B (AMB) a terápiai koncentrációban (1 mg/L) fungicidnek bizonyult a dél-ázsiai, kelet-ázsiai, dél-afrikai és dél-amerikai kládból származó izolátumok 33%-ával, 50%-ával, 50%-ával és 16,7%-ával szemben (Papp és mtsai. 2021). Ezzel szemben Dudiuk és munkatársai >2 mg/L AMB alkalmazásával koncentrációfüggő, de izolátum-független ölü aktivitásról számoltak be az általuk vizsgált kilenc kolumbiai izolátummal szemben az idő-ölés vizsgálatukban (Dudiuk és mtsai. 2019).

Jelen tanulmány célja, hogy összehasonlítsa a négy fő kládból (dél-ázsiai, kelet-ázsiai, dél-afrikai és dél-amerikai) származó *C. auris* izolátumok *in vivo* virulenciáját, valamint meghatározza az AMB *in vivo* hatékonyságát neutropéniás egér modellben letalitási kísérletek, szöveti gombaterhelés (fungal burden) meghatározások és hisztopatológiai vizsgálatok által.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1. A *Candida auris* fertőzések epidemiológiája

2009-ben a Tokyo-i Metropolitan Geriatric Hospital egy 70 éves női betegének külső hallójáratának fülváladékból azonosították, majd írták le elsőként a *C. auris*-t, mint új *Candida* fajt (Sato és mtsai. 2009). Nem sokkal később a retrospektív vizsgálatok 15 újabb, 2004 és 2006 között gyűjtött dél-koreai fül izolátumról bizonyították be, hogy az újonnan felfedezett fajhoz tartoznak a törzsek, amelyeket korábban tévesen *Candida haemulonii*-ként identifikáltak (Kim és mtsai. 2009). Az első hat invazív izolátum szintén dél-koreai betegek mintáiból nyert törzsek voltak, amiből kettőt véráramból izoláltak, amelyeket 1996-ban egy 1 éves gyermek mintáiból tenyésztettek ki (Lee és mtsai. 2011).

Egy évtizeddel a felfedezését követően világszerte már több mint 4000 izolátumot azonosítottak vérből és más mintákból. Az, hogy a *C. auris* sokáig rejtve tudott maradni, elsősorban annak köszönhető, hogy a hagyományos diagnosztikai módszerekkel a faj azonosítása nehézkes, a vizsgált törzseket gyakran azonosították tévesen *C. haemulonii*-nak, *Candida duobushaemulonii*-nak, *Candida sake*-nek, vagy *Rhodotorula glutinis*-nak; megbízható eredménnyel csak a MALDI-TOF és a molekuláris biológiai módszerek szolgálnak (Watkins és mtsai. 2022).

A teljes genom analízis igazolta a *C. auris* filogenetikai rokonságát a *C. haemulonii*-val és a *Candida lusitanae*-val, valamint a vizsgálatok alapján 6 földrajzi kládot határoztak meg (dél-ázsiai, kelet-ázsiai, dél-afrikai, dél-amerikai, iráni és szingapúri). Egy adott földrajzi területen a törzsek genetikailag hasonlóak, viszont az irodalmi adatok alapján az egyes kládok között szignifikáns különbségek vannak fenotípus és virulencia alapján (Sears és mtsai. 2017; Szekely és mtsai. 2019).

Napjainkra jelentős változáson ment keresztül az invazív *C. auris* fertőzések epidemiológiája, mivel a korai időszak szórványos invazív fertőzéseit mára felváltották a nagy betegszámú nosocomiális járványok. Számos tanulmány értekezik arról, hogy amikor a kórokozó bekerül egy egészségügyi intézménybe, a fertőzés gyorsan terjed az arra érzékeny betegek között és rövid idő alatt kórházi járvány alakul ki (Armstrong és mtsai. 2016; Ruiz-Gaitán A és mtsai. 2018; Villanueva-Lozano H és mtsai. 2021). A fertőzés tekintetében különösen veszélyeztetettek a magas kockázatú betegek (malignitás, kemoterápia, neutropénia, nagy dózisú kortikoszteroid terápia, AIDS, krónikus alapbetegségek). Kockázati tényezőnek tekinthető a hasi műtét, a hasnyálmirigy-

gyulladás, a hemodialízis, a széles spektrumú antibiotikumok és azolok használata, illetve a hosszan tartó intenzív osztályos kezelés (<https://www.pathologyoutlines.com/topic/microbiologycauris.html>). 2009 és 2020 között számoltak be járványokról az Amerikai Egyesült Államokban, Kanadában, Mexikóban, az Egyesült Királyságban, Spanyolországban, Indiában, Pakisztánban, Oroszországban, Szaúd-Arábiában, Ománban, Kuvaitban, Kenyában, Dél-Afrikában és Kolumbiában (Chowdhary és mtsai. 2017; Ahmad és mtsai. 2021).

Az *in vitro* vizsgálatok során az Egyesült Államokban izolált törzsek 90%-át találták rezisztensnek flukonazol, 30%-át amfotericin B és 0,5%-át echinocandinok iránt (<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-antifungal.html>), az új generációs azol-származékok (isavukonazol, posakonazol) ellenben jó *in vitro* aktivitást mutatnak az izolátumok ellen. A pontos rezisztencia mechanizmusok megismerése még napjainkban is zajlik, de az már ismeretes előttünk, hogy a multidrug efflux pumpák megjelenése a sejt falban okozza az az antifungális szerek intracelluláris koncentrációjának csökkenését, amiket pontmutációk (CDR1 / CDR2 és MDR1) és transzkripciós faktorok (TAC1 és MDR1) szabályoznak. Az ERG11 gén mutációi felelősek az azol-származékokkal szembeni rezisztenciáért, mivel a génről átíródó enzim szerkezeti változása meggátolja az azolok kötődését (Kordalewska és mtsai. 2018; Pristov és mtsai. 2019).

A rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján az echinocandinok az elsődlegesen választandó antifungális szerek invazív *C. auris* fertőzés esetén, de még a megfelelő terápia mellett is a mortalitás 60% (Rossato és mtsai. 2018; Lockhart és mtsai. 2019). Napjainkban a *C. auris* elsődleges fontosságú kórokozónak számít a WHO által közölt lista alapján (Kim és mtsai. 2024).

### **3.2. A *Candida auris* virulencia faktorai**

Bár a *C. auris* biológiája még sok tekintetben ismeretlen előttünk, az *in vitro* vizsgálatok bebizonyították, hogy számos, a *Candida* fajokra jellemző virulencia faktor expressziójára képes (szekretált aszpartil proteinázok, foszfolipázok, proteinázok, adhezinek), valamint a biofilmek kialakításának képességével is rendelkezik (Kumar és mtsai. 2015; Sherry és mtsai. 2017).

A *C. auris* virulenciájának kulcsfontosságú elemei a szekretált aszpartil proteinázok (SAP), ezeknek az enzimeknek fontos szerepük van az adhézióban, a biofilm és a sejt fal-

képződésben, valamint a gazdaszövet lebontásában. A SAP enzimekről azt is bebizonyították, hogy a gyulladásos válaszok megelőzésén keresztül képesek az immunrendszer komplement rendszerét szabályozni és ezáltal segíteni a gombasejt védekezését az immunrendszer elemeivel szemben (Rapala-Kozik és mtsai, 2018). A *C. auris* genomjában 4 SAP ortológ gént azonosították. A protektív SAP enzimek aktivitása 42°C-on emelkedett, ami azt jelzi, hogy a *C. auris* magasabb hőmérsékleten jobb túlélőképességgel rendelkezik, mint más *Candida* fajok (Chatterjee és mtsai. 2015).

A foszfolipázok az enzimek egy másik csoportját alkotják, amelyek szintén hozzájárulnak a biofilm képzéshez, a gazdaszövet bontásához és az immunrendszer elleni védekezéshez. Egy „knock-down” kísérlet során, azok a *C. parapsilosis* izolátumok, amelyek a foszfolipáz enzimek termelésének a képességét elvesztették, nem tudtak olyan hatékonyan védekezni az immunsejtekkel szemben, mint a kontroll izolátum, és a makrofágok könnyebben kebelezték be őket (Ghannoum és mtsai, 2000, Gacser és mtsai. 2007). A foszfolipáz szekréció a *C. auris* esetében egy törzs-függő képesség, mindössze az izolátumok 37,5% képes rá, ezzel szemben proteinázokat az izolátumok 64%-a képes szekretálni. Vizsgálatok során bizonyítást nyert, hogy a *C. albicans* által termelt foszfolipázokkal összehasonlítva, a *C. auris* foszfolipázai hatékonyságukban alulmaradnak (Larkin és mtsai. 2017).

Egy másik kulcsfontosságú virulencia faktor a biofilm képzés, amely során a gombasejt mannán-glükán poliszacharidokat választ ki azért, hogy kialakítson egy olyan poliszacharid mátrixot, amelyben védve van a külső környezeti hatásokkal szemben. A jelenség kezdetén a *C. auris* sejtek adhezin fehérjék segítségével rögzítik magukat egy felülethez, majd a megtapadást követően a biofilm rétegei megvastagodnak, áthatolhatatlan gátat képezve ezzel az antifungális szerek és az immunrendszer elemei előtt. Vizsgálatok kimutatták, hogy az efflux pumpákat irányító gének a biofilm kialakulása során felülszabályozódnak, elősegítve ezzel az antifungális szerek eliminálását (Bravo és mtsai. 2021).

Számos esettanulmány értekezik arról, hogy a biofilmek komoly szerepet játszanak a fertőzések nosocomiális terjedésében. A *C. auris* fokozottan ellenálló a fertőtlenítőszerrel szemben, különösen a biofilm kialakulását követően. Egy vizsgálat során 13 gyakran használt kórházi fertőtlenítőszer hatékonyságát tesztelték *C. auris* biofilmekkel szemben, a vizsgált termékek 58%-a nem tudta megállítani a *C. auris*

terjedését, az 50%-a nem volt hatással a sejtek életképességére, és a fertőtlenítőszeres 75%-a nem tudta megállítani a biofilm visszanövekedését (Ledwoch és mtsai. 2018).

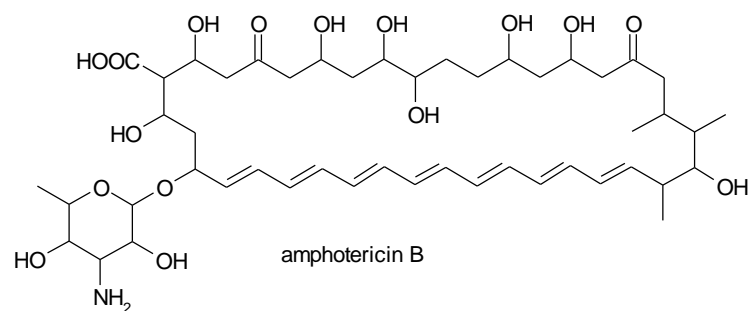
A patogén gombák esetében a morfológiai plaszticitás alapvető fontosságú mind a virulencia, mind pedig a környezeti változásokra adott válaszreakciók szempontjából. A filamentózus növekedés a gombák egyik fontos patogenitási jellemzője, mivel a hifa képzés megkönnyíti a kolonizálandó környezet feltárását. Lényeges morfológiai különbség a *C. albicans* és a *C. auris* között, hogy az utóbbi nem megy át morfológiai váltáson az élesztősejt és a hifa formák között, a fonál képzés hiánya pedig magyarázat a fajok közötti kolonizációs különbségekre: amíg a *C. albicans* képes kolonizálni a nyálkahártya felületeit, addig a *C. auris* elsősorban a bőrt kolonizálja (Borman és mtsai. 2016). Bizonyos hatások esetén, mint amilyen a hőmérséklet, a sejtciklus leállás vagy az antifungális szerek DNS károsító hatása, megfigyelték a *C. auris* sejtek elongációját, filamentációját és adott esetben a pszeudohifa képződését (Yue és mtsai. 2018; Bravo és mtsai. 2020). Egyes *C. auris* izolátumoknál megfigyelhető az a jelenség, hogy mind *in vitro*, mind pedig *in vivo* nagyméretű sejt-aggregátumokat képeznek. A mikroszkópos vizsgálatok alapján a jelenség hátterében az áll, hogy a bimbózás során az anyasejtről elszakadó leánysejtek mennyisége ezeknél az izolátumoknál csökkent. Borman és munkatársai a *Galleria mellonella* lárváival végzett *in vivo* kísérleteik során úgy tapasztalták, hogy az aggregatív törzsek virulenciája kisebb a nem-aggregatív izolátumokéhoz képest. A dél-afrikai kládhoz tartozó izolátumok nagy hányada (84%) aggregatív sajátossággal rendelkezik (Borman és mtsai. 2016).

### **3.3 Antifungális szerek invazív *Candida* fertőzések kezelésére**

#### **3.3.1. Amfotericin B**

Az amfotericin B-dezoxikolát (AMB) a poliének csoportjába tartozó antifungális szer, amelyet először a *Streptomyces nodosus* fermentlevéből izolált anyagcsereterméként azonosítottak, de napjainkban már szintetikusán állítják elő. Többszörösen telítetlen gyűrűje hidrofil és hidrofób tulajdonságú oldalláncokat tartalmaz (**1. ábra**) (Carolus és mtsai. 2020; Hamill 2013). A molekula mérsékelt oldhatóságának és elégtelen orális hasznosulásának következtében a készítményeket parenterálisan alkalmazzák, mindemelett hosszú felezési idővel rendelkeznek, ezért a napi egyszeri adagolás az ajánlott. Az ergosterolhoz kötődve csatornát képez a sejtmembrán felszínén, előidézve ezzel az

intracelluláris kálium kiáramlását és a víz beáramlását, ami a sejtek pusztulását idézi elő. A molekula erősen kötődik az emlős sejtek szteroljaihoz, ez magyarázza az akut mellékhatások (hidegrázás, láz, fejfájás) megjelenését, valamint a hosszabb (10-14 nap) terápiák után bekövetkező veseelégtelenséget (Carolus és mtsai. 2020; Hamill 2013). A gyógyszer intravénás alkalmazása évtizedeken keresztül „gold-standard”-nak számított az antifungális terápiában, majd a toxicitás csökkentése érdekében 3 lipid-asszociált formulát vezettek be a klinikai gyakorlatba. Bár a klinikai hatékonyság az invazív *Candida* fertőzések kezelése tekintetében nem nő, viszont a veseelégtelenség gyakorisága csökkenthető a lipid-asszociált AMB formák használatával, bár a készítmények alkalmazását korlátozza a magas beszerzési költségük. (Thompson és mtsai. 2009).



1. ábra Az amfotericin B szerkezeti képlete (Majoros és Kardos, 2008)

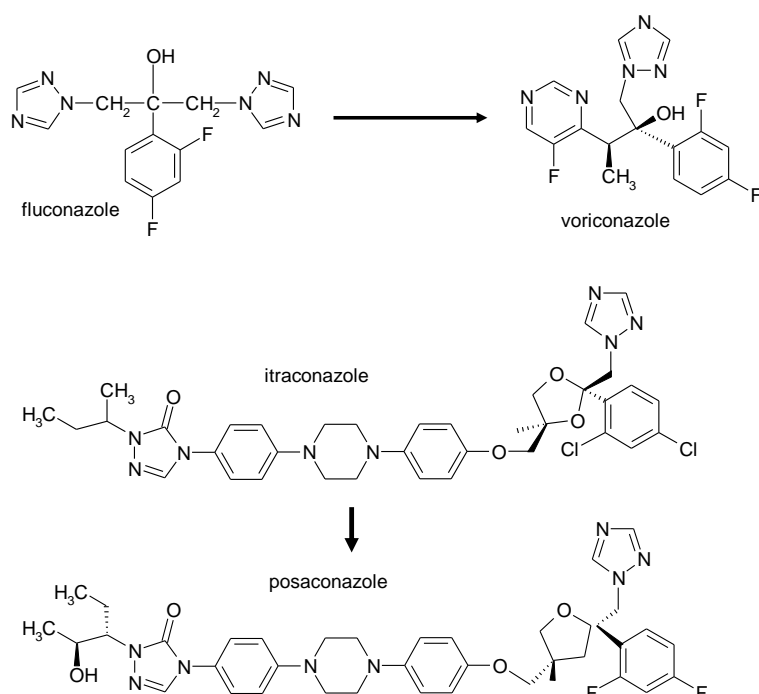
Az AMB széles spektrumú antifungális hatással rendelkezik, a legtöbb sarjadzó-, fonalas- és dimorf gomba faj ellen kitűnő aktivitással bír. Az AMB-vel szemben primer rezisztenciával rendelkeznek az *Aspergillus terreus* és a *Trichosporon* fajok (Hamill és mtsai. 2013; Pfaller és mtsai. 2004). *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* és *C. lusitaniae* fajok esetén a fungicid hatás eléréséhez szükséges idő *in vitro* 2 mg/L dózisú AMB kezelés eredményeképp kevesebb, mint 13,3 óra, ellenben *C. krusei*, *C. tropicalis* és *C. parapsilosis* fajok esetén még 48 óra elteltével sem tökéletes a gombasejtek eliminációja, a gyógyszer hatása fungisztatikus (Cantón és mtsai. 2004).

A molekula jelentős mértékben (>95%) kötődik a szérumfehérjékhez, ami a farmakológiai aktív gyógyszer mennyiségének csökkenését eredményezi, ezért a szérumban az aktív, szabad gyógyszer szintje az 1 mg/L értéket sohasem éri el (0,744 mg/L). A magas fehérjekötődés következményeként feltételezhető, hogy az AMB az agyi parenchimában akkumulálódik, ezért nem rendelkezik kellő hatásfokkal a meningitis kezelése terén (Thompson és mtsai. 2009). A lipid-asszociált készítmények lényegesen

jobb központi idegrendszeri penetrációval rendelkeznek, a dezoxikolát formulához képest a csúcskoncentráció akár 7-szer magasabb is lehet (Arikan és mtsai. 2001).

### 3.3.2. Triazol típusú antifungális szerek

A szisztémás fertőzések kezelésére használt triazol típusú antifungális szerek a flukonazol, az itraconazol, a vorikonazol, a posaconazol és az isavukonazol (Lass-Flörl. 2011; Thompson és mtsai. 2009) (**2. ábra**). Ezek molekulák a citokróm P-450-dependens lanoszterol-14- $\alpha$ -demetiláz enzim gátlása által a lanoszterol-ergoszterol átalakulást akadályozzák meg, aminek következtében toxikus hatású 14- $\alpha$ -metilált szterolok halmozódnak fel, ezek meggátolják a gombasejt szaporodását, ami egy fungisztikus hatást eredményez (Majoros és Kardos, 2008).



**2. ábra.** A szisztémásan alkalmazható triazolok szerkezeti képletei (Majoros és Kardos. 2008)

A **flukonazol** (FLU) az összes triazol típusú antifungális szer közül a leggyakrabban alkalmazott gyógyszer mind terápiában, mind pedig profilaxisban. A legtöbb *Candida* fajjal, valamint a *Cryptococcus neoformans*-al szemben jól alkalmazható. Kivételt képeznek ez alól a *C. krusei*, a *C. inconspicua* és a *C. norvegensis*, mivel ezek a fajok primer rezisztenciával rendelkeznek a gyógyszerrel szemben. A molekula csekély mértékben (12%) kötődik a szérumfehérjékhez, farmakokinetikája linearitást mutat, azaz a terápiás dózis növelésének mértékével nő a szérumban lévő gyógyszer koncentrációja

(Lass-Flörl. 2011; Thompson és mtsai. 2009). A FLU az invazív fertőzések kezelése terén jól alkalmazható, mivel a gyógyszer szöveti penetrációja kitűnő, alkalmazását viszont korlátozza a szűk spektruma és a fungisztatikus hatása.

A **vorikonazol** (VOR) a flukonazol származéka, ebből fakadóan a gyógyszer hatásspektruma megegyezik FLU spektrumával, de kiegészül az *Aspergillus* fajokkal (Sipsas és mtsai. 2009; Thompson és mtsai. 2009). A gyógyszer intravénás és orálisan alkalmazható formában egyaránt elérhető. A molekula jelentős mértékben (58%) kötődik a szérumfehérjékhez, farmakokinetikája a felnőttekben nem-lineáris. A VOR terápia során az első kezelés alkalmával telítő dózisként 12 mg/kg kerül alkalmazásra, majd ezt követően a napi dózis 6 mg/kg. *Candida* fajok ellen a VOR nem elsőként alkalmazandó antifungális szer (Pappas és mtsai. 2016).

Az **itrakonazol** (ITR) egy hosszú lipofil oldallánccal rendelkező molekula, hatásspektruma a VOR-hoz hasonló. Az ITR nagymértékben (99%) kötődik a szérumfehérjékhez. A gyógyszer két orálisan alkalmazható készítménye is elérhető, kapszula és hidroxipropil-béta-ciklodextrinnel komplexált orális oldat formájában. Az orális oldat biohasznosulása közel 80%-os. 1999 óta intravénás kiszerezésben is elérhető, de a VOR piacra kerülését követően az alkalmazása jelentősen háttérbe szorult (Lass-Flörl. 2011).

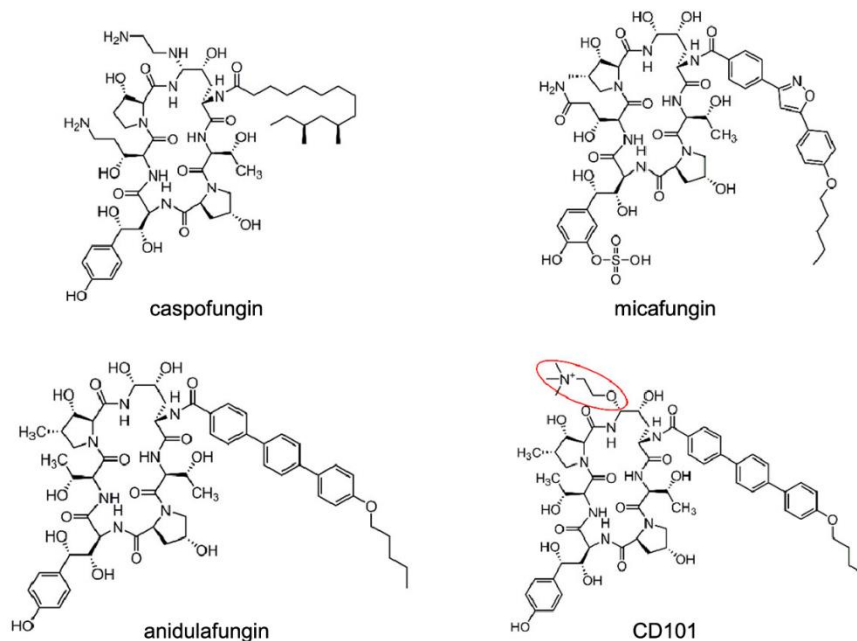
A **posakonazol** (POSA) az itrakonazol származéka és a triazol típusú antifungális szerek között a legszélesebb hatásspektrummal rendelkező gyógyszer, valamint jó aktivitással rendelkezik a FLU-rezisztens izolátumok egy részével szemben. A *Candida* és *Aspergillus* fajok mellett, kiváló *in vitro* aktivitással rendelkezik a *Mucor* fajok nagy része ellen is (Sabatelli és mtsai. 2006). A molekula 99%-ban kötődik a szérumban lévő fehérjékhez. A POSA jelenleg elérhető orális szuszpenzió, késleltetett hatóanyag-leadású tableta és intravénás oldat formájában (McKeage, 2015).

Az **isavukonazol** (ISA) az invazív aszpergillózis és mucormycosis kezelésére alkalmazzák elsősorban. Nagyfokú aktivitással rendelkezik a legtöbb *Aspergillus* fajjal szemben, többek között az *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* és *A. terreus* fajokkal, valamint számos *Mucorales* faj ellen (Allen és mtsai. 2015). A készítmények az ISA vízben oldódó *prodrug*, azaz előgyógyszer alakját, az isavuconazoniumot tartalmazzák. A készítmények orálisan alkalmazható kapszula és intravénás oldat formájában érhetőek el.

Napi egyszeri adagolás engedélyezett a gyógyszer hosszú felezési ideje miatt. A molekula nagymértékben (>99%) kötődik a szérumfehérjékhez.

### 3.3.3. Echinocandinok

Az echinocandinok félszintetikus lipopeptidek, olyan ciklikus hexapeptidekből épülnek fel amelyekhez egy acil-oldallánc kötődik. Jelenleg a kereskedelmi forgalomban négy echinocandin érhető el: a kaszpopungin (CAS), a mikafungin (MCF), az anidulafungin (ANF) és a rezafungin (RZF) (3. ábra).



**3. ábra** A kaszpopungin, a mikafungin, az anidulafungin és a rezafungin (CD101) szerkezeti képlete (Yanan Zhao, Winder B. Perez, Cellular microbiology 2016, CD101: a novel long-acting echinocandin).

Antifungális hatásukat a  $\beta$ -1,3-D-glükán-szintáz enzimkomplex gátlásán keresztül fejtik ki, ami a sejtfal szintézis inhibíciójához vezet. A sejtfal szintézis gátlása a sejt ozmotikus instabilitását, majd a sejt pusztulását eredményezi (Chen és mtsai. 2011; Denning 2003; Emri és mtsai. 2013). Az echinocandinok a *Candida* fajok többségével szemben *in vitro* fungicid hatással bírnak, viszont az *Aspergillus* fajok ellen a hatásuk csak fungisztatikus. *C. neoformans*, a *Fusarium* fajok és a járomspórás gombák ellen hatástalanok (Chen és mtsai. 2011; Denning 2003). Jól alkalmazhatóak invazív *Candida* fertőzések kezelésére, nagy előnyük az AMB-vel szemben, hogy a terápia jelentősen kevesebb mellékhatással jár. A készítmények csak intravénás formában érhetőek el, mivel az echinocandinok a gasztrointesztinális rendszerből csak csekély mértékben szívódnak fel. A központi idegrendszerbe és a szembe a penetrációjuk gyenge. A készítmények napi egyszeri

adagolása ajánlott az echinocandinok hosszú felezési ideje miatt. A felnőtt kezelték esetén ANF és CAS terápiája esetén az első nap telítő dózist kell adni (ANF: 200 mg, CAS: 70 mg), majd ezt követően fenntartó napi dózisokat kell alkalmazni (ANF: 100 mg, CAS: 50 mg). Az MCF kezelés során nincs szükség telítő dózusra, standard 100 mg napi dózissal ajánlott a terápiát végezni (Pappas és mtsai. 2016). Nagymértékben kötődőnek a szérumban lévő fehérjékhez, farmakokinetikájuk linearitást mutat. Az antifungális terápia tervezése során fontos szem előtt tartani az echinocandinok azon farmakokinetikai sajátosságát, hogy miután az antifungális szer a vérből a szövetekbe penetrált, ott akkumulálódik, és ha csökken a vérben a gyógyszer koncentrációja, akkor visszaáramlik a keringésbe (Sandhu és mtsai. 2004).

### **3.4. Invazív gomba fertőzések hisztopatológiai vizsgálata**

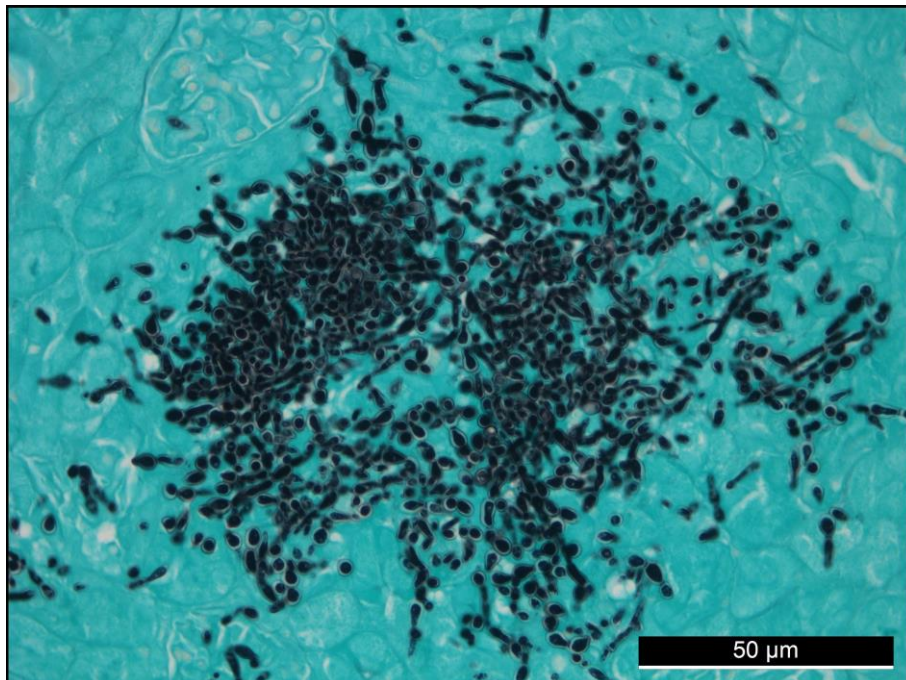
A fungális patogének szelektív azonosítására a hisztológiában kevés technika áll a patológusok rendelkezésére, de azok kielégítő mértékben képesek ezeknek a kórokozónak az identifikálására. Fontos azonban megjegyezni, hogy a szükséges morfológiai ismeretek nélkül még az adott patogén nemzettségének a megállapítása is nehézségekbe ütközhet, a faj azonosítása pedig szinte lehetetlen, ezért ezeknek az ismereteknek az elsajátítása elengedhetetlen a rutin diagnosztikai gyakorlatban.

A szövettani diagnosztikában két olyan eljárás terjedt el, amit a patológus szakma széles körben elfogad, mint a gombasejtek hisztológiai azonosítására alkalmas eljárás: a perjódsav-Schiff reakció (PAS) és a Gömöri-Grocott-féle ezüstmeténamin reakció (GMS) (Guarner és mtsai. 2011; Barak és mtsai. 2010). Mindkét eljárás elfogadható érzékenységgel és szelektivitással rendelkezik ahhoz, hogy a vizsgált kórokozók fénymikroszkópban azonosíthatóak legyenek, és általában kombinációban kerülnek alkalmazásra.

A két eljárás közül a PAS az érzékenyebb, de kevésbé szelektív technika. A módszer alapja a perjódsavas vagy más néven Malaprade oxidáció, aminek lényege az, hogy a poliszacharidok vicinális hidroxilcsoportjainak az oxidációja útján aldehidcsoportokat generálunk és mivel a perjódsav ezeknek a csoportoknak a tovább oxidációjára már nem képes, így a folyamat során azokat nem veszítjük el. Ez azért lényeges, mert az eljárásban alkalmazott színeképző rendszer a Schiff-reagens csak ezekkel a csoportokkal képes kondenzálódni és színes végtermékké alakulni. A Schiff-reagens vagy más néven

leukofukszin, egy kromofórcsoportját elveszített pararozanilin molekula, egy trifenilmetán, aminek a quinoindgyűrűjének szerkezetében olyan változás következett be, aminek eredményeképpen a vegyület elvesztette a színes jellegét. Az aldehidcsoporttal történő kondenzáció következtében a molekula visszanyeri a kromofórcsoportját, aminek folyamánaképpen püspöklila színreakcióval azonosítja a reakció helyét (Barak és mtsai. 2010; Hajar és mtsai. 2016).

A PAS reakció a szöveti struktúra széleskörű vizsgálatát teszi lehetővé, ezáltal az egyik leggyakrabban alkalmazott hisztokémiai reakció a szövettani diagnosztikában. Alkalmas a glikogén, a neutrális nyákok, a bazális membrán és a gombák sejtfalát alkotó kitin (N-acetil-glükózamin) vizsgálatára.



**4. ábra** *Candida albicans* (3666-os izolátum). Neutropéniás egér vese szövettani vizsgálata  
GMS reakcióval (400x nagyítás).

A GMS egy kifejezetten a gombák azonosítására kifejlesztett eljárás (**4. ábra**), aminek megalkotása a neves magyar patológushoz, Gömöri Györgyhöz kötődik, amit aztán Robert G. Grocott tökéletesített, bár sajnálatosan az utókor az előbbiről gyakran megfeledkezik (Gomori 1946; Grocott 1955). A GMS reakció működési mechanizmusát tekintve részben hasonló a PAS reakcióhoz, az eljárás első lépése ez esetben is a gombasejtfalát alkotó N-acetil-glükózamin polimer vicinális hidroxilcsoportjainak (1,2-glikolcsoportok) az aldehidcsoportokká történő oxidációja, ellenben ezt úgy végezzük, hogy a vizsgálat szempontjából aspecifikusnak tekinthető egyéb poliszacharidok a

színképzés során intaktak maradnak. Ezt oly módon érhetjük el, hogy az oxidációs lépés során a króm-trioxid vizes oldatát, a krómsavat használjuk. A krómsav egy nem-szelektív oxidáns, a hidroxilcsoportok oxidációja során előbb aldehid-, majd pedig azokból karboxilcsoportokat képez, ami alapvetően hátrányos lenne, de ha szabályozottan végezzük, akkor lehetőséget teremt arra, hogy fókuszáljunk a vizsgálatot a hidroxilcsoportokban gazdag gombasejtfalra. Ha a meghatározott koncentrációjú krómsavval végzett oxidációt adott időben megállítjuk (5%-os krómsav: 60 perc, 10%-os krómsav: 20 perc), akkor a humán szövetben található poliszacharidok (glikogén, nyák, bazális membrán) már túloxidálódtak és elveszítették az aldehidcsoportjaikat, de a gombasejtfalat alkotó kitin még mindig tartalmazni fog vizsgálható mennyiségben. Az oxidációból nyert aldehidcsoportokat ezüstmeténaminnal demonstrálhatjuk, egy színképző rendszerrel, ami ezüst-nitrát és hexametilén-tetramin elegyéből áll. Az aldehidcsoportok redukív hatására az ezüst-nitrát fémezüstté redukálódik ammónia kilépése közben, amihez az ammónia forrást a reakció során a hexametilén-tetramin szolgáltatja (Carson és mtsai. 2010). A reakció helyét, azaz a gomba sejtfalát alkotó kitint fekete színreakció jelzi a fénymikroszkópban.

## 4. Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki, hogy meghatározzuk az általunk rendelkezésre álló *C. auris* klinikai izolátumok *in vivo* virulenciáját neutropéniás egérmódelben, a nyert adatokat pedig össze kívántuk hasonlítani a kontrollként alkalmazott *C. albicans* törzsek eredményeivel. A vizsgálat sorozat folytatásaként célunk volt megvizsgálni az amfotericin B *in vivo* hatékonyságát az általunk reprezentatívnak ítélt *C. auris* izolátumokkal szemben.

**4.1.** Neutropéniás egérmódelben kívántuk megvizsgálni a négy földrajzi kládból származó *C. auris* izolátumok (dél-ázsiai n = 5, kelet-ázsiai n = 4, dél-afrikai n = 5 és dél-amerikai n = 5) *in vivo* virulenciáját *C. albicans* kontrollal szemben.

**4.1.1.** A túlélési kísérletek során meg kívántuk határozni a vizsgált *C. auris* izolátumok *in vivo* virulenciáját a letalitási ráta alapján, az eredményeket a *C. albicans* kontroll izolátumok eredményeinek tükrében kívántuk értékelni.

**4.1.2.** Célul tűztük ki, hogy meghatározzuk és összehasonlítjuk a *C. auris* izolátumokkal és a kontrollként alkalmazott *C. albicans* izolátummal fertőzött csoportok szöveti perzisztenciáját szervtenyésztés útján a szív, a vesék, a máj, és a lép szöveteiben.

**4.1.3.** Szövettani vizsgálatok segítségével jellemezni kívántuk a fungális invázó hisztopatológiai sajátosságait *C. auris* és *C. albicans* izolátumokkal fertőzött egerek szív, vese, máj és lép szöveteiben.

**4.2.** Meg kívántuk vizsgálni az amfotericin B *in vivo* hatékonyságát neutropéniás egerekben *C. auris* izolátumok ellen (dél-ázsiai n = 2; kelet-ázsiai n = 2; dél-afrikai n = 2; dél-amerikai n = 4; amiből kettő környezeti eredetű).

**4.2.1.** Túlélési kísérlet segítségével kívántuk meghatározni az amfotericin B *in vivo* hatékonyságát a kezelt és kezeletlen csoportok túlélési rátájának összehasonlító elemzése alapján.

**4.2.2.** Célunk volt, hogy szervtenyésztés útján meghatározzuk az amfotericin B terápia *in vivo* hatékonyságát a kezelt és kezeletlen csoportok szöveti perzisztenciája tekintetében a vizsgált egerek szív, vese és agy szöveteiben.

**4.2.3.** Célul tűztük ki, hogy szövettani vizsgálatok segítségével jellemezzük az amfotericin B terápia *in vivo* hatékonyságát a szöveti invázó hisztopatológiai sajátosságainak tekintetében a fertőzött egyedek szív, vese és agy szöveteiben.

## 5. Anyagok és módszerek

### 5.1. A *Candida auris* izolátumok eredete

A *C. auris*-szal végzett kísérleteinkben a vizsgált izolátumok az Egyesült Királyság Nemzeti Mikológiai Referencia Laboratóriumából származtak, az izolátumok kládszintű besorolásához Prof. Andrew Borman és munkatársai 28S rRNS és/vagy ITS1 régiókra irányuló szekvenálást alkalmaztak (Borman és mtsai. 2017). A vizsgálatok során a 3666-os és 2606-os számú, véráramfertőzésből származó *C. albicans* klinikai izolátumokat használtuk összehasonlító kontrollként (**1.-2. táblázat**).

Klád	Faj és izolátum száma	Ország	Minta eredete	Aggregáció
Dél-Ázsia	<b><i>C. auris</i> 196</b>	Omán	Vér	-
	<i>C. auris</i> 20 (NCPF 8985)	Anglia	Sebváladék	-
	<b><i>C. auris</i> 164</b>	Anglia	Sebváladék	-
	<i>C. auris</i> 10 (NCPF 8971)	Anglia	Sebváladék	-
	<i>C. auris</i> 27 (NCPF 89891)	Anglia	Pleurális folyadék	-
Kelet-Ázsia	<i>C. auris</i> típus törzs (NCPF 13029=CBS 10913)	Japán	Külső fül	-
	<b><i>C. auris</i> 15</b> (NCPF 8984)	Japán	Külső fül	+
	<i>C. auris</i> 12372 (CBS 12372)	Dél-Korea	Vér	+
	<b><i>C. auris</i> 12373 (CBS 12373)</b>	Dél-Korea	Vér	+
Dél-Afrika	<i>C. auris</i> 185	Anglia	Vér	+
	<i>C. auris</i> 228	Anglia	Bőr	+
	<b><i>C. auris</i> 206 (NCPF 13042)</b>	Anglia	Vér	+
	<b><i>C. auris</i> 204</b>	Anglia	Traheosztóma	+
	<i>C. auris</i> 2 (NCPF 8977)	Anglia	Likvor	+
Dél-Amerika	<b><i>C. auris</i> I-24</b>	Izrael	Vér	-
	<i>C. auris</i> I-156	Izrael	Vér	-
	<i>C. auris</i> I-172	Izrael	Vér	-
	<i>C. auris</i> 13108 (CDC B-13108)	Panama	Kórházi környezet	-
	<b><i>C. auris</i> 16565 (CDC B-16565)</b>	Kolumbia	Kórházi környezet	-
-	<b><i>C. albicans</i> 3666</b>	Magyarország	Vér	-
-	<i>C. albicans</i> 2606	Magyarország	Vér	-

**1. táblázat.** A *Candida auris* és *Candida albicans* virulenciájának összehasonlító vizsgálata során a letalitási kísérletekben alkalmazott 19 *Candida auris* és két *Candida albicans* izolátum származási hely szerint. A félkövér betűkkel írt izolátumok a szöveti perzisztencia, illetve a szövettani vizsgálatokban is alkalmazásra kerültek.

Klád	Faj és izolátum száma	Ország	Minta eredete	Aggregáció
Dél-Ázsia	<i>C. auris</i> 196	Omán	Vér	-
	<i>C. auris</i> 27 (NCPF 89891)	Anglia	Pleurális folyadék	-
Kelet-Ázsia	<i>C. auris</i> 12372 (CBS 12372)	Dél-Korea	Vér	+
	<i>C. auris</i> 12373 (CBS 12373)	Dél-Korea	Vér	+
Dél-Afrika	<i>C. auris</i> 204	Anglia	Traheosztóma	+
	<i>C. auris</i> 2 (NCPF 8977)	Anglia	Likvor	+
Dél-Amerika	<i>C. auris</i> I-24	Izrael	Vér	-
	<i>C. auris</i> I-156	Izrael	Vér	-
	<i>C. auris</i> 13108 (CDC B-13108)	Panama	Kórházi környezet	-
	<i>C. auris</i> 13112 (CDC B-13112)	Kolumbia	Kórházi környezet	-

**2. táblázat.** Az amfotericin B *in vivo* hatékonyságát vizsgáló kísérletünk letalitási, szöveti perzisztencia, illetve szövettani vizsgálataiban alkalmazott *Candida auris* izolátumok származási hely szerint.

### 5.3. A kísérletben felhasznált egerek immunszuppresszálsa

A kísérletekben BALB/c neutropeniás nőstény egereket (21-23g) alkalmaztunk, csoportonként 7-11 egyed (Charles River Laboratories), melyek gondozását a „Laboratóriumi Állatok Alkalmazása és Gondozása” című útmutatóban leírtak szerint végeztük. Az *in vivo* kísérletek engedély számai: 12/2008 és 12/2014 DE MÁB.

A kísérletre szánt egyedek a fertőzést megelőző negyedik napon 150 mg/kg, a fertőzést megelőző napon pedig 100 mg/kg ciklofoszfamidot (Endoxan, Egyetemi Gyógyszertár, Debrecen) kaptak intraperitoneálisan (Andes és mtsai. 2010; Kovács és mtsai. 2014). A tartós neutropeniás állapot fenntartása érdekében a fertőzést követő második, illetve az ötödik napon 100 mg/kg ciklofoszfamidot kaptak, majd ezt követően minden harmadik napon a kísérlet időtartama alatt.

### 5.4. A fertőzés menete

A fertőzés előtt 24 órával az izolátumokat Sabouraud-agar táptalajra szélesztettük, majd 35 °C-on inkubáltuk őket a fertőzés kezdetéig. Steril vattatampon segítségével a kifejlődött gombapázsitot a táptalaj felszínéről összegyűjtöttük és fiziológiás sóoldatba szuszpendáltuk. Az összegyűjtött gombasejteket 10 percig 3000 g fordulaton centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítását követően a leülepedett sejtekhez 25 mL

fiziológiás sóoldatot pipettáztunk és újabb 10 percig centrifugáltuk, majd ezt a mosási folyamatot még kétszer megismételtük.

Nyolc mL fiziológiás sóoldatot adtunk a leülepedett sejtekhez a felülúszó eltávolítását követően. A sejtszámolást Bürker-kamrában végeztük a szuszpenzió 1:100 arányú hígításából. Az elkészült inokulum csíraszámát kvantitatív kioltással ellenőriztük. A dél-afrikai és kelet ázsiai kládból származó *C. auris* izolátumok esetén megfigyelhető volt a sejtek aggregációja (Borman és mtsai. 2017), ezért a jelenség kiküszöbölésére ezeket az inokulumokat fiziológiás sóoldat helyett PBS-ben készítettük el.

A kísérletre szánt egerek fertőzése laterális farokvénán keresztül történt, egyedenként 0,2 mL gombasejt szuszpenzió került beoltásra. *C. auris* izolátumok esetén  $10^7$  CFU/mL gombasejt mennyiséget kaptak mind a letalitási, mind pedig a szervi perzisztencia kísérletekben. A *C. albicans* izolátumokkal fertőzött egyedek a letalitási kísérletben  $10^5$ , a szervi perzisztencia kísérletben pedig  $5 \times 10^4$  CFU/mL gombasejt mennyiséget kaptak. A kísérletek során alkalmazott dózisokat az előkísérleteink során állapítottuk meg.

### **5.5. Amfotericin B kezelés**

Az amfotericin B *in vivo* hatékonyságát vizsgáló letalitási és szöveti perzisztencia kísérletek során a kezelt csoport egyedei a fertőzést követően 24 órával 1 mg/kg amfotericin B-t kaptak 0,5 ml térfogatban intraperitoneálisan, majd az ezt követő négy napban ezt megismételtük. A kontroll csoportok egyedei 0,5 mL steril fiziológiás sóoldatot kaptak intraperitoneálisan (Bayegan és mtsai. 2011).

### **5.6. Letalitási kísérlet**

A letalitási kísérletek során az egyes csoportok megfigyelése 21 napig tartott. A vizsgálat időtartama alatt az egyedek neutropeniás állapotát folyamatosan fenntartottuk. Az egyes csoportok egyedeit naponta kétszer ellenőriztük és amennyiben a szisztémás fertőzés súlyos jeleit mutatták, vagyis az alapvető létfenntartási funkcióikra (mozgás, táplálkozás) már képtelenek mutatkoztak, a további szenevedésük elkerülése végett cervikális diszlokációval elpusztítottuk őket.

### 5.7. Szervtenyésztés

A szöveti perzisztencia vizsgálatok során a fertőzést követő hatodik napon a vizsgált csoportok egyedeit cervikális diszlokáció útján elpusztítottuk és ezt követően felboncoltuk. A *C. auris* és *C. albicans* izolátumok virulenciájának összehasonlító vizsgálata során, azért hogy információt nyerjünk a fertőzés korai szakaszából is, a kísérletben olyan csoportok is résztvettek, amelyek egyedeit már a fertőzést követő második napon felboncoltuk. Mind a második napi, mind pedig a hatodik napi boncoláson a vese, a lép, a máj és a szív került eltávolításra. Az AMB *in vivo* hatékonyságát vizsgáló kísérlet során a vese, a szív és az agy került eltávolításra. Az egyes szervek tömegét lemértük és steril dörzscsészében homogenizáltuk, majd a homogenizátumhoz 1 mL steril fiziológiás sóoldat hozzáadását követően 1:10-es alapú hígítási sort készítettünk. A hígításokból 100 µL-t oltottunk ki Sabouraud-agar táptalajra. A táptalajokat 35°C-on inkubáltuk 48 órán keresztül, majd a kinőtt telepeket megszámloltuk. A kitenyészett gombák számát CFU/g értékben adtuk meg, a kimutatás alsó határa 50 sejt/szövet (gramm) volt (Bayegan és mtsai. 2011).

### 5.8. Szövettani vizsgálat

A *C. auris* és *C. albicans* virulenciájának összehasonlító vizsgálata során a vese, a lép, a máj és a szív, az amfotericin B *in vivo* hatékonyságát vizsgáló kísérlet során pedig a vese, a szív és az agy szövetekből végeztünk hisztopatológiai vizsgálatokat. Az eltávolított szerveket 24 óráig 10%-os formalinban fixáltuk. A szerv preparátumok a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Kenézy Gyula Campus Patológiai Osztályán kerültek feldolgozásra. A szerv preparátumokból paraffinos blokk technikával 4 µm vastagságú szöveti metszetek készültek, amelyeken Hematoxin-Eozin (H&E) festést alkalmaztunk a szöveti morfológia általános vizsgálata céljából. A gombasejtek azonosítására Perjódsav-Schiff (PAS) reakciót használtunk (Pupim és mtsai. 2017). A kontrakciós-sáv nekrosis kimutatása céljából Mallory-féle foszforwolframsavas hematoxin (PTAH) festést alkalmaztunk a szív szöveti mintákon.

### 5.9. Vizelettenyésztés

Az AMB *in vivo* hatékonyságát vizsgáló letalitási kísérleteink során felmerült részünkről az igény, hogy információt nyerjünk a kísérletben résztvevő kezelt és kezeletlen

csoporthoz állapotáról még az egyedek pusztulását megelőzően. Ezt a szándékunkat egy megfigyelésünk tette lehetővé, miszerint az egyedek intraperitoneális oltása során a húgyhólyag fölötti enyhe transzabdominális nyomás az állatok kényszeres vizeletürítését eredményezi. Ezt a jelenséget használtuk arra, hogy mintát gyűjtsünk vizelettenyésztés céljából. A periurethralis régió fertőtlenítését követően steril Eppendorf csövekbe gyűjtöttük az általunk nyert, átlagosan 50-80 µl mennyiségű vizelet mintákat és ezekből azonnal 1:10-es alapú sorozat hígítást készítettünk. Az egyes hígításokból 100 µL-t oltottunk ki Sabouraud-agar táptalajra, majd azokat 35°C-on inkubáltuk 48 órán keresztül. A kinőtt telepeket megszámoztuk és a telepszámokból meghatároztuk a CFU/ml-t.

#### **5.10. Statisztikai elemzés**

A letalitási kísérletekben a statisztikai analízist a Kaplan-Meier teszt segítségével végeztük. A szervi perzisztencia vizsgálatokban, a táptalajon kitenyészett gombák statisztikai vizsgálatához Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk (GraphPad Prism 4.03, Windows). Szignifikánsnak tekintettük az eredményt  $p < 0,05$  érték esetén (Andes és mtsai. 2010; Bayegan és mtsai. 2011). Az AMB-vel kezelt és a kezeletlen csoportok vizeletéből meghatározott CFU/ml értékeket Student's t-próbával hasonlítottuk össze.

## 6. Eredmények

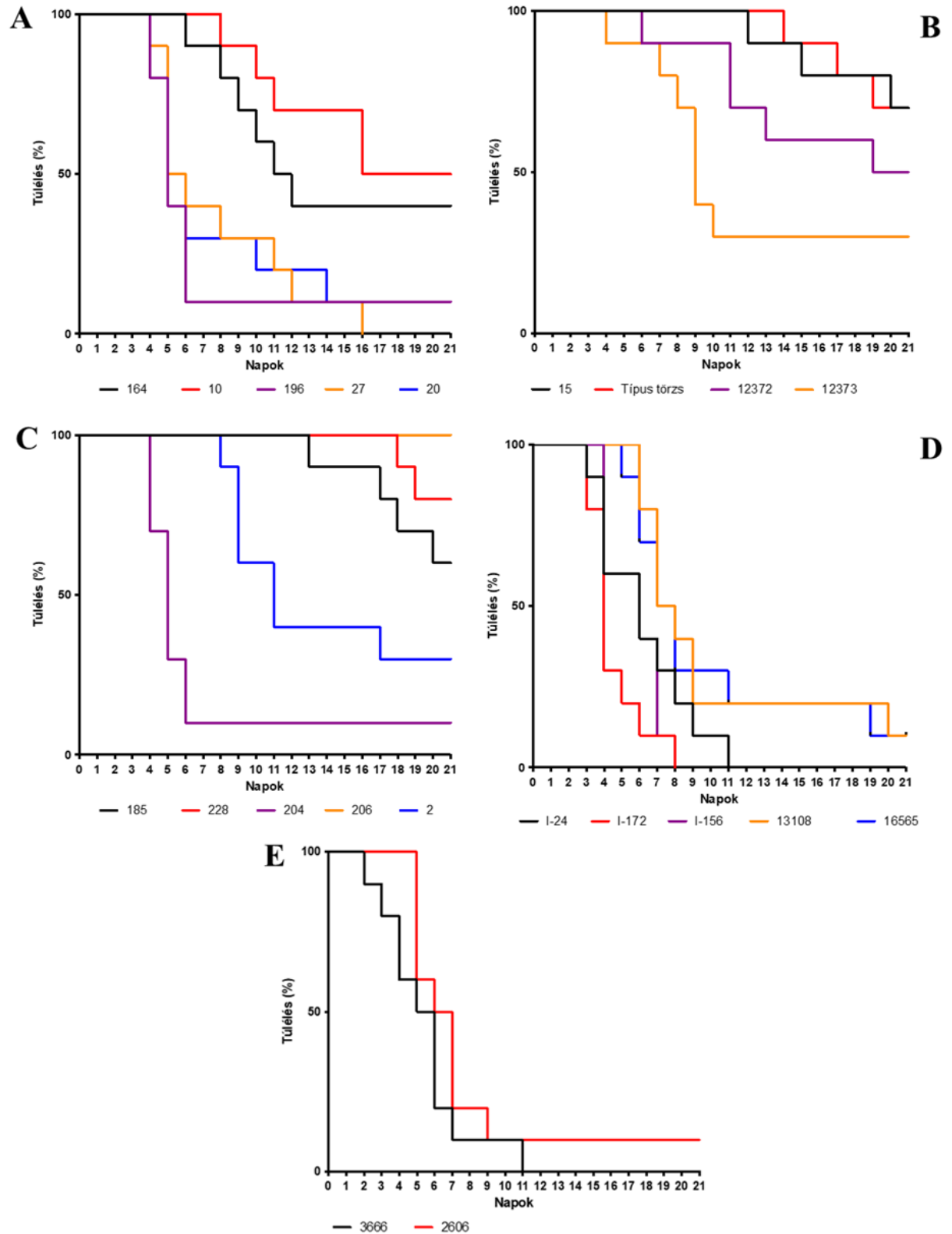
### 6.1. *Candida auris* és *Candida albicans* virulenciájának összehasonlító vizsgálata neutropéniás egérmodellben

#### 6.1.1. *Candida auris* kládok és *Candida albicans* virulenciája a letalitás alapján

A letalitási kísérletek során a *C. auris* izolátumokkal fertőzött csoportok egyedeinél nem volt megfigyelhető különösebb állapot romlás, egészen a hirtelen bekövetkező elhullásukig, a létfenntartáshoz szükséges képességek (mozgás, táplálkozás) hiányát nem mutatták, ez alól egyedül a dél-amerikai kládhoz tartozó törzsekkel fertőzött csoportok képeztek kivételt. Olyan tüneteket, amelyek a központi idegrendszeri érintettségre utaltak volna, szintén nem voltak tapasztalhatók. Az egyes kládakon belül szignifikáns különbségek voltak a letalításban (dél-amerikai:  $P=0,0005$ , dél-ázsiai:  $P=0,0010$ , dél-afrikai:  $P<0,0001$ , kelet ázsiai:  $P=0,0255$ ) (5. ábra).

A csoportok 21 napos megfigyelése alatt a dél-amerikai klád tagjai bizonyultak a legvirulensebbnek, ahol az átlagos halálozási ráta 96% volt (ez egyes izolátumok esetén: 90-100%). A dél-ázsia klád tagjaival fertőzött csoportok esetén szintén magas, átlagosan 80%-os halálozást figyeltünk meg (ez egyes izolátumok esetén: 50-100%). Az ezekkel az izolátumokkal fertőzött egerekre jellemző volt a nagyon korai elhullás, már a fertőzést követő harmadik-negyedik napon megfigyelhető volt az egyedek nagy számú pusztulása, ezt prezentálja a túlélési görbék meredek zuhanása is (5. ábra). A dél-afrikai és a kelet-ázsia kládakhoz tartozó izolátumokkal fertőzött csoportok esetén jóval szerényebb halálozási értékeket tapasztaltunk, mindkét klád esetén az átlagos halálozás 45% volt. A vérből származó dél-koreai izolátumnál a halálozás 50-70% volt. Az egyedek viszonylag későn, a hetedik-nyolcadik napon kezdtek pusztulni, többnyire naponta egy-két elhullás volt csak tapasztalható, a túlélési görbe elnyúlt, lépcsőzetes esése erről tanuskodik (5. ábra).

A kontrollként alkalmazott két *C. albicans* izolátummal fertőzött csoport halálozása 90-100% volt ( $P>0.05$ ). A fertőzött egyedek a szisztémás fertőzés jegeit mutatták, egészen az elhullásukig nehezükre esett a mozgás, a táplálkozás. A fertőzést követő ötödik napon a csoportok 50-60%, a hetedik napon pedig a 80-90% exitált, ez annak tükrében, hogy a fertőzéshez használt gombasejt mennyisége század része volt a *C. auris* izolátumokkal fertőzött csoportokhoz képest, jól reprezentálja a két *Candida* faj közötti virulenciabeli különbségeket (5. ábra).



**5. ábra.** Neutropéniás, *Candida auris*-és *Candida albicans* klinikai izolátumokkal intravénásan oltott BALB/c egerek túlélése. *Candida auris* esetén a dél-ázsiai kládból 5 (A), a kelet ázsiai kládból 4 (B), a dél-afrikai kládból 5 (C) és a dél-amerikai kládból 5 (D) izolátumot vizsgáltunk. Két *Candida albicans* izolátumot is vizsgáltunk (E).

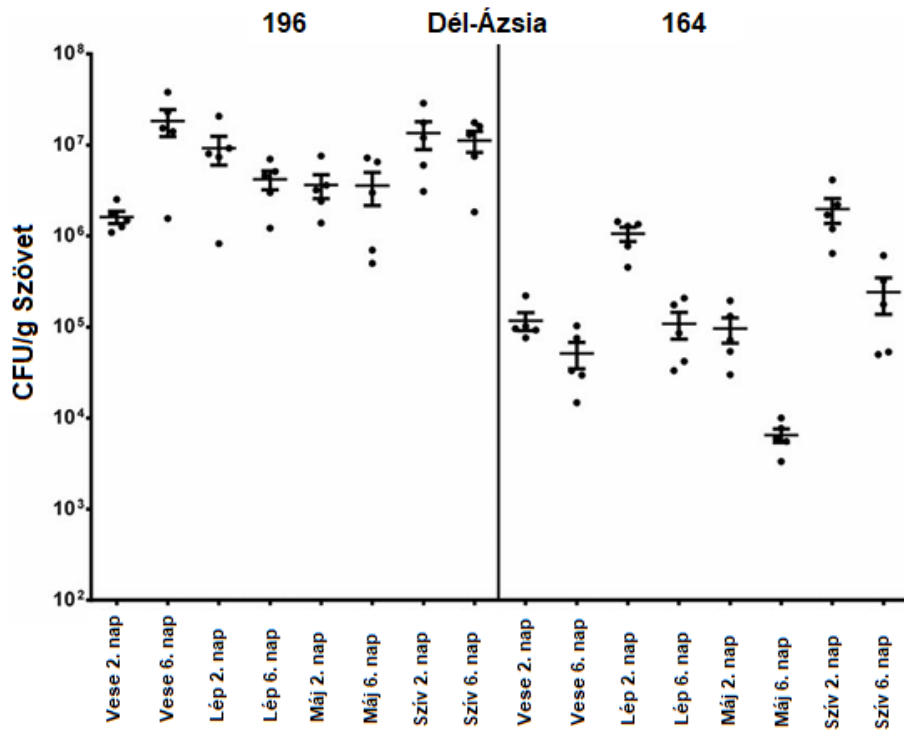
### **6.1.2. *Candida auris* kládok és *Candida albicans* virulenciája a szöveti perzisztencia alapján**

A *C. auris* izolátumokkal fertőzött csoportok szöveti perzisztencia vizsgálatai során úgy találtuk, hogy a szív és a vese érintettsége fokozottabb volt a másik két szervhez képest, kládtól függetlenül. A szervekből kitenyészett gombasejtek mennyisége alapján az is megállapítható volt, hogy a virulencia és a szöveti perzisztencia között szoros összefüggés van, mivel a letalitási vizsgálatokban virulensebb izolátumok esetén a szervek nagyobb gombaterhelése volt tapasztalható. Legalább egy nagyságrendbeli különbség volt megfigyelhető a magas letalitású (90-100%) (**6. ábra, 9. ábra**) és a mérsékelt letalitású (30-60%) (**7. ábra, 8. ábra**) izolátumok szív és vese szöveti perzisztencia eredményei között. A virulensebb izolátumok második és hatodik napi boncolásából származó szív és vese szöveti gombaterhelése közötti különbség is jelentősebbnek bizonyult, mint a mérsékeltébbek esetében.

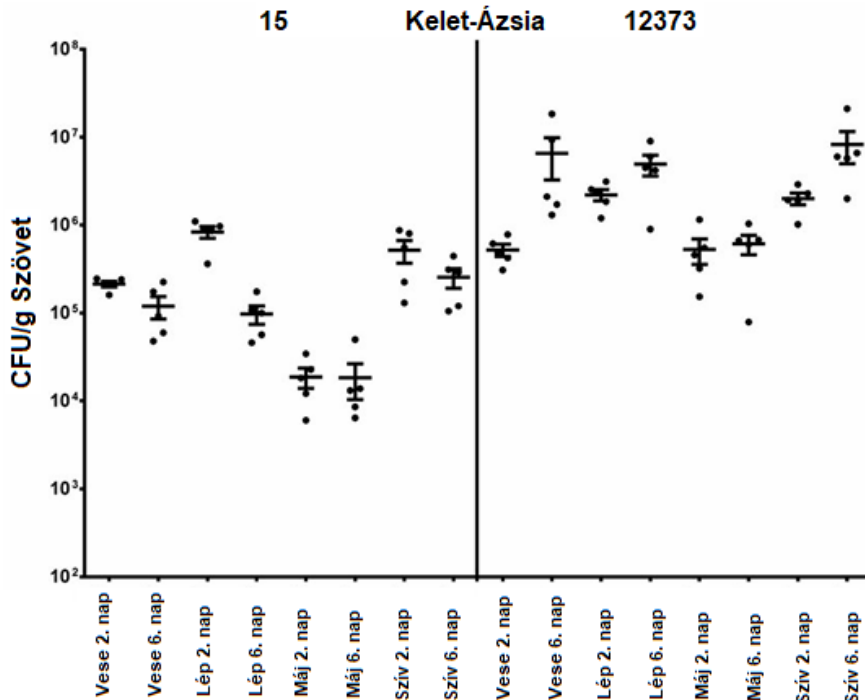
A második napi boncolásból származó eredmények alapján a lép gombaterhelése hasonló mértékű volt minden izolátum esetén ( $P>0,05$ ), szignifikánsan nagyobb csíraszámot csak a hatodik napi boncolásból nyert, 16565-ös, dél-amerikai izolátummal fertőzött csoport egyedeinek a szervtenyészetének eredményei mutattak (**9. ábra**) összevetésben a kelet-ázsiai 15-ös (**7. ábra**), valamint a dél-ázsiai 164-es (**6. ábra**) izolátumok eredményeivel ( $P<0,001$ ).

A vizsgált szervek közül a máj szöveti perzisztenciája volt a legalacsonyabb. A 196-os, dél-ázsiai izolátummal fertőzött csoport egyedeinek a mintáinál tapasztaltuk a legmagasabb csíraszámot ( $3.6 \times 10^6$  CFU/g), a legkevesebbet pedig az ugyanehhez a kládhoz tartozó 164-es izolátum esetében ( $6.5 \times 10^3$  CFU/g) (**6. ábra**).

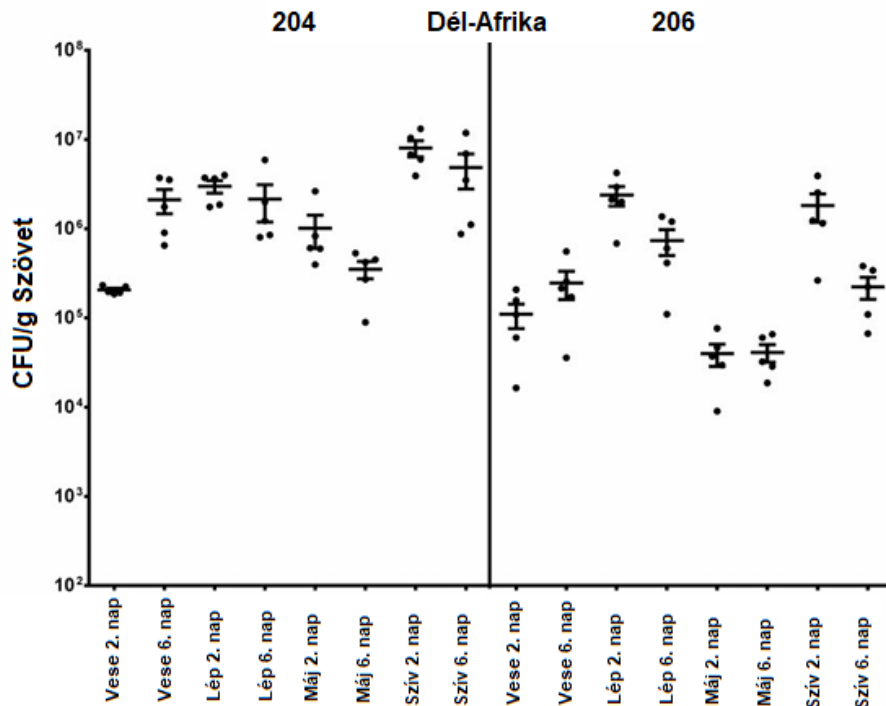
A *C. albicans* izolátummal (3666) fertőzött csoport egyedeinek a második és hatodik napi szervtenyészetek az eredményeit összehasonlítva szignifikáns mértékű növekedést figyeltünk meg a szív ( $P=0,016$ ), a vese ( $P=0,008$ ) és a lép ( $P=0,008$ ) esetében, ellenben a máj szöveti perzisztenciája kevesebb mint  $10^4$  CFU/g volt mind a két napon (**10. ábra**), ami alacsonyabb mint a magas letalitású *C. auris* izolátumok esetén tapasztalt értékek. A hatodik napi boncolásból származó szív és vese szervtenyészetek gombasejt számai hasonlóak voltak a magas letalitású *C. auris* izolátumok eredményeihez (**6. ábra, 9. ábra**).



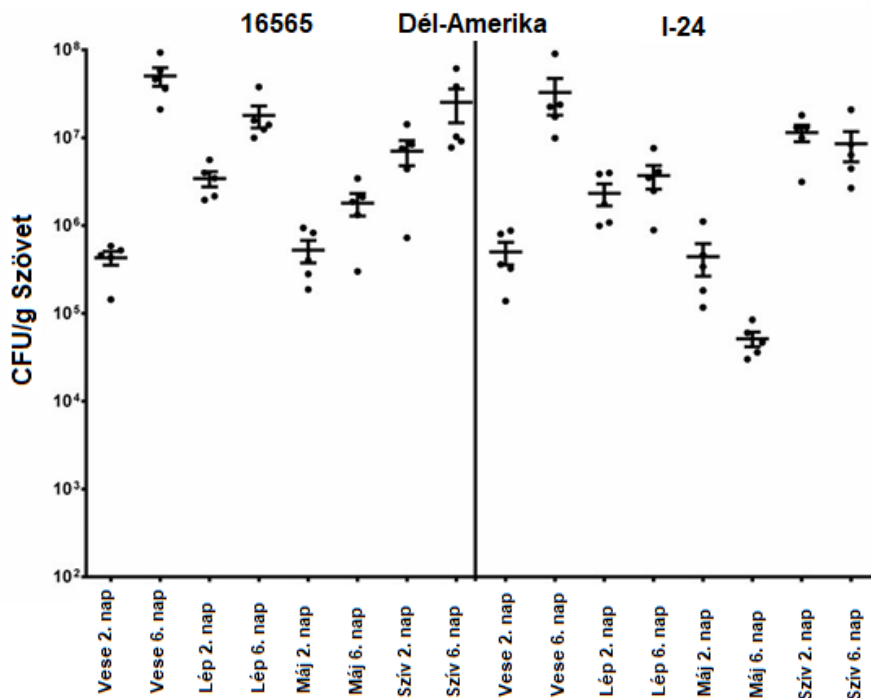
**6. ábra.** A belső szervekből (vesék, lép, máj és szív) kitenyészett gombasejtek száma neutropéniás, BALB/c egerekből. Az egereket két, a dél-ázsiai kládból származó *Candida auris* izolátummal intravénásan fertőztük, majd a második és a hatodik napon elvégeztük a szervi perzisztencia vizsgálatát.



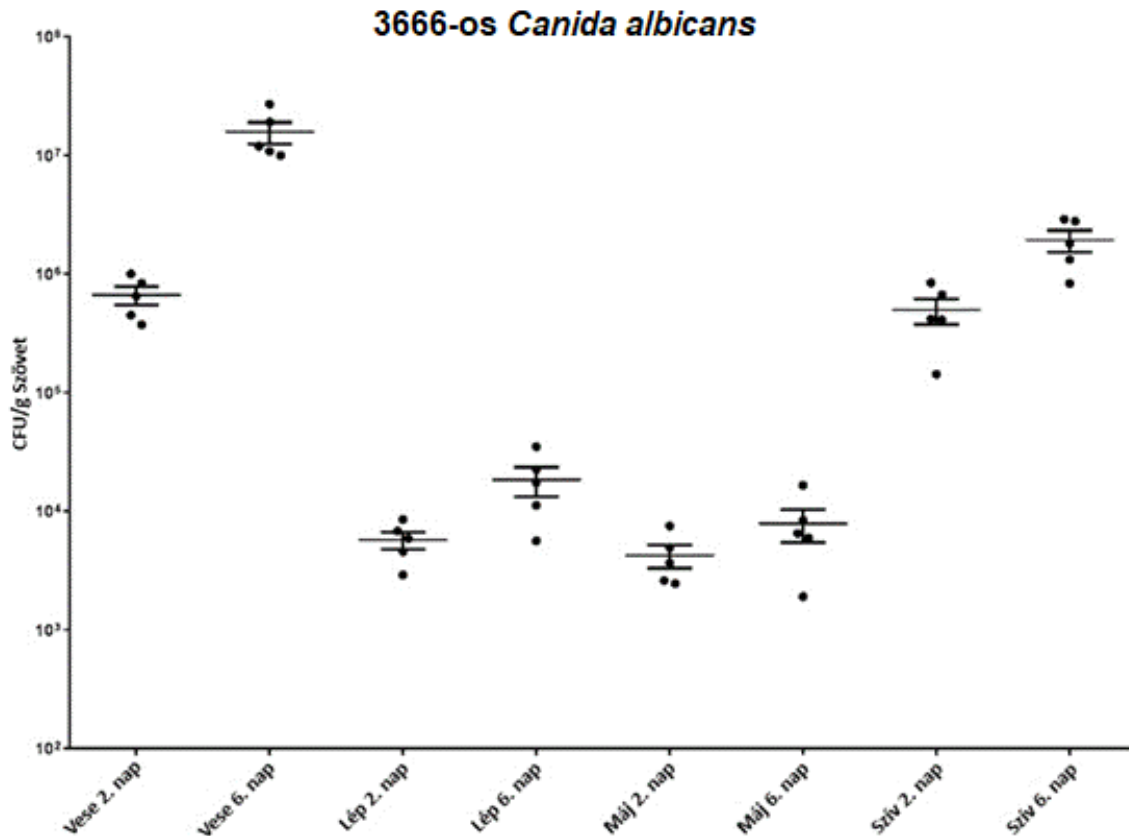
**7. ábra.** A belső szervekből (vesék, lép, máj és szív) kitenyészett gombasejtek száma neutropéniás, BALB/c egerekből. Az egereket két, a kelet-ázsiai kládból származó *Candida auris* izolátummal intravénásan fertőztük, majd a második és a hatodik napon elvégeztük a szervi perzisztencia vizsgálatát.



8. ábra. A belső szervekből (vesék, lép, máj és szív) kitenyészett gombasejtek száma neutropéniás, BALB/c egerekből. Az egereket két, a dél-afrikai kládból származó *Candida auris* izolátummal intravénásan fertőztük, majd a második és a hatodik napon elvégeztük a szervi perzisztencia vizsgálatát.



9. ábra. A belső szervekből (vesék, lép, máj és szív) kitenyészett gombasejtek száma neutropéniás, BALB/c egerekből. Az egereket két, a dél-amerikai kládból származó *Candida auris* izolátummal intravénásan fertőztük, majd a második és a hatodik napon elvégeztük a szervi perzisztencia vizsgálatát.



**10. ábra.** A belső szervekből (vesék, lép, máj és szív) kitenyésztett gombasejtek száma neutropéniás, BALB/c egerekből. Az egereket a 3666-os számú *Candida albicans* izolátummal intravénásan fertőztük, majd a második és a hatodik napon elvégeztük a szervi perzisztencia vizsgálatát.

### 6.1.3. *Candida auris* kládok virulenciája a szív, a vesék, a máj, és a lép szövettani vizsgálata alapján

A szöveti perzisztencia kísérletekhez oltott csoportokból kládonként két egyedet használtunk fel a szövettani vizsgálatokhoz, valamint a szív korai érintettségének vizsgálata céljából minden kládból egy-egy egyedet felboncoltunk 24 órával a fertőzést követően. A letalitási kísérletek hét frissen elhullott példányát is felboncoltuk és megvizsgáltuk. A vizsgálatokhoz a dél-ázsiai 196-os, a kelet-ázsiai 12373-as, a dél-afrikai 204-es és a dél-amerikai I-24-es izolátummal fertőzött csoportok egyedeit használtuk.

Mind a hatodik napon boncolt, mind pedig a letalitási kísérletekben elhullt példányok szerveiben nagy kiterjedésű, gombasejt aggregátumok voltak megfigyelhetők, ami alól egyedül a lép volt kivétel. A vizsgált szervekben blasztonidiumokat és bimbódzó

sejteket találtunk, de hifát vagy pszeudohifát egyik izolátum esetében sem sikerült azonosítanunk.

A szív korai érintettsége már 24 órával a fertőzést követően megfigyelhető volt, a miokardium arterioláiban nagyszámban találtunk bimbózó gombasejteket és blasztokonidiumokat. Függetlenül a fertőzéshez használt izolátumtól, a hatodik napon boncolt és a letalitási kísérletekben elhullt egyedek szívizomrostjai között nagyszámú gombasejt aggregátumokat tapasztaltunk a szívizomsejtek koagulációs nekrozisával. Mallory-féle PTAH festéssel vizsgálva az is megállapítható volt, hogy a szívizomrostok elvesztették a harántcskolatukat, ezzel jelezve a kontrakciós-sáv nekrozis vagy másnéven a miofibrilláris degeneráció jelenségét (**11.-12. ábra**).

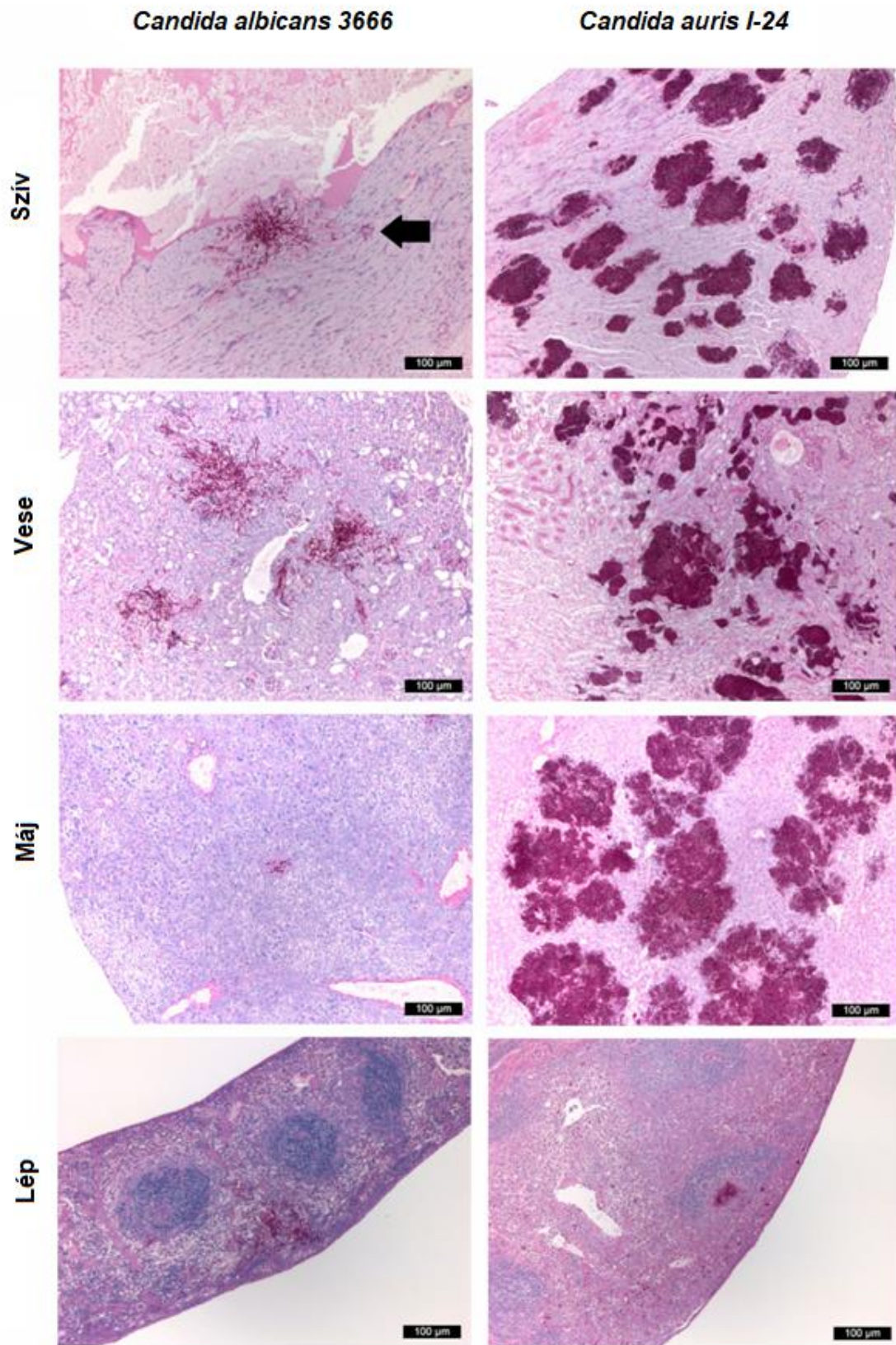
A vesék vizsgálata során a veseparenchima multifokális infiltrációját tapasztaltuk. A vesetubulusok destrukciója, valamint nagyméretű nekrotizáló régiók voltak megfigyelhetők, de a glomerulusokat a gombasejtek kolonizációja nem érintette (**11. ábra**).

A máj szövetében nagyméretű gombasejt aggregátumokat találtunk a dilatált szinuszoidokban, a parenchimában a gombasejtek radiálisan terjedtek tovább, a lobulusok centrális nekrozisával. A májban a dilatált szinuszoidok gombasejtek tömegével teltek, megfigyelhető a lebenyek központi nekrozisa és a hepatociták vakuoláris degenerációja.

A lép kisméretű szöveti érintettsége volt tapasztalható a vizsgálatok során, alacsony sejtszámú gombasejt csoportokat, blasztokonidiumokat és bimbózó gombasejteket figyeltünk meg (**11.-12. ábra**).

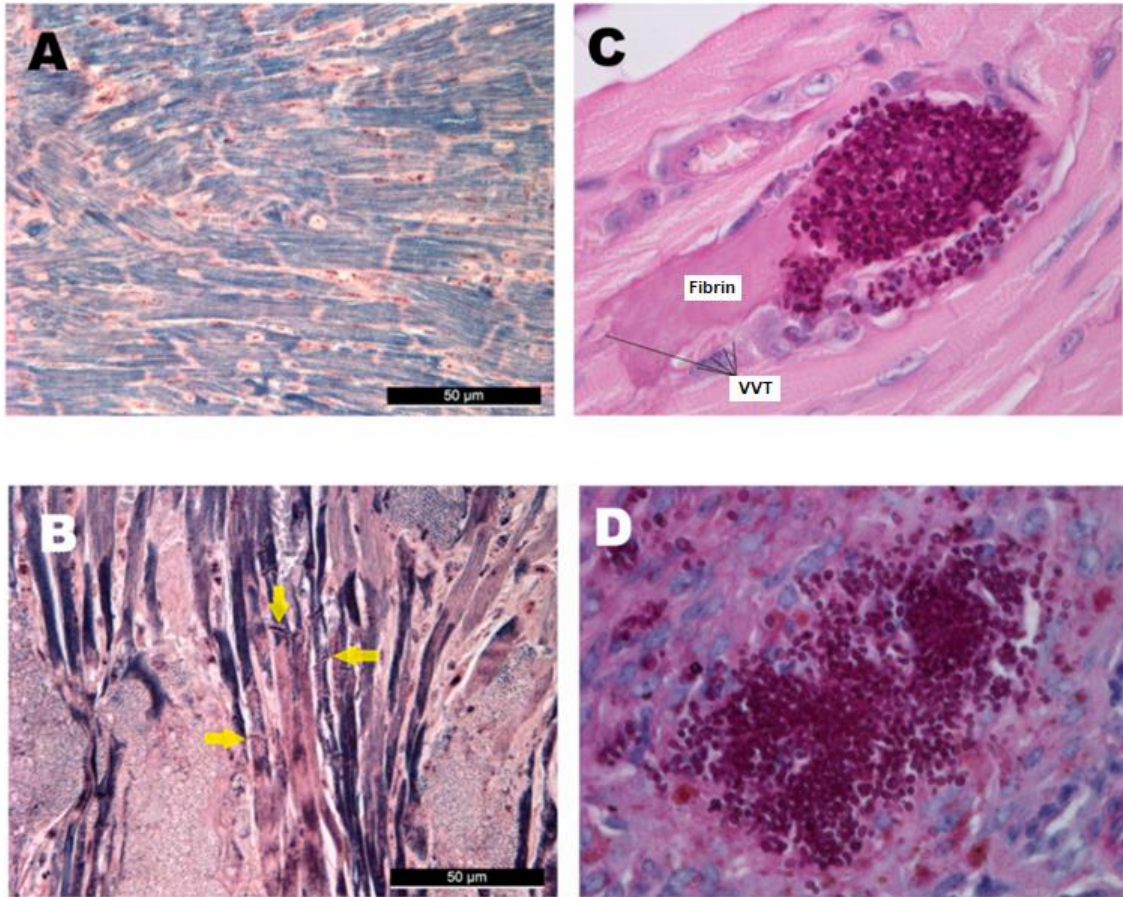
#### **6.1.4. *Candida albicans* virulenciája a szív, a vesék, a máj, és a lép szövettani vizsgálata alapján**

A 3666-os számú *C. albicans* izolátummal fertőzött egyedek szöveteiben blasztokonidiumok, bimbózó gombasejtek voltak megfigyelhetők. A szívben, a vesékben és a lépben pszeudohifák és hifák is megtalálhatóak voltak, ellenben a máj szöveti mintáiban azok nem voltak felfedezhetőek. A szív szövettani vizsgálata során nagyméretű nekrotizáló régiók voltak megfigyelhetők mind az endokardiumban, mind pedig a miokardiumban, de a *C. auris* izolátumokkal fertőzött egyedeknél tapasztalt kontrakciós-sáv nekrozis jeleit nem találtuk (**11. ábra**).



**11. ábra.** Neutropéniás egerek szív, vese, máj és lép szövettani vizsgálata PAS festéssel, amelyeket előzetesen intravénásan fertőztünk meg a 3666-os *Candida albicans* izolátummal (bal oldali oszlop), illetve az I-24-es *Candida auris* izolátummal (jobb oldali oszlop), a vizsgálatokat hat nappal a fertőzést követően végeztük el (100x nagyítás). A *C. albicans* esetében a szívben mind az endo-, mind

miokardiális érintettség megfigyelhető, a szubendokardiális miokardium a legmarkánsabban érintett. A szívizomban a kezdődő érinvázio jeleit láthatjuk (fekete nyíl). A vesében a *C. albicans* a veseparenchimában, a tubulusokban és a glomerulusokban megfigyelhető. A májban blasztokonídiumokat és bimbózó gombasejteket mutattunk ki, viszont hifa képződést nem tapasztaltunk. A lépben pszeudohifák és hifák láthatók a vörös pulpában.



**12. ábra.** *Candida auris* 196-os izolátumával oltott neutropéniás egerek szívének (A, B, C) és lépének (D) szövettani képei PAS és Mallory-féle PTAH festéssel. A 196-os törzssel fertőzött egér szívében a fertőzést követő ötödik napon nagyszámú gombasejt aggregátum látható, amelyek a szívizomrosrok disztorziójához vezettek (B). Mallory-féle PTAH festéssel a normal szív (A) szövettani képével összehasonlítva a moribund egér szívében kontrakciós-sáv nekrosis látható (sárga nyilak) (B). A szív arterioláiban (C) és a lépben (D) a fertőzést követő első napon PAS festéssel blasztokonídiumok és bimbózó gombasejtek láthatók, de pszeudohifa és hifa nem (A-B  $\times 400$  nagyítás, C-D  $\times 1000$  nagyítás, vvt: vörösvértest).

## **6.2. Amfotericin B *in vivo* hatékonysága *Candida auris* ellen**

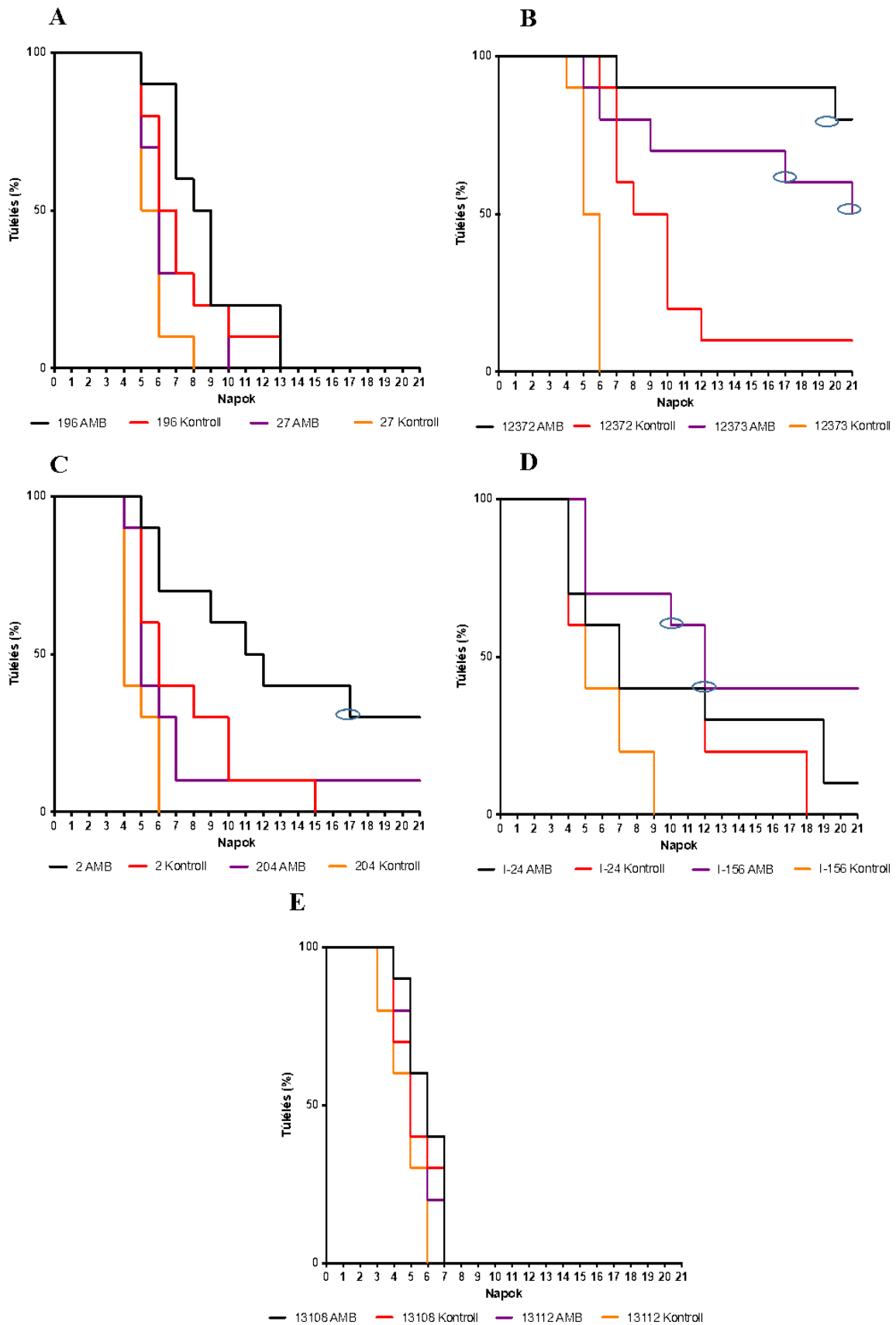
### **6.2.1. Amfotericin B *in vivo* hatékonysága a letalitás alapján**

A két dél-ázsiai kládból származó izolátummal fertőzött csoport esetében az AMB terápia nem befolyásolta az egerek túlélését. A fertőzést követő 13. napra a kezelt csoportokban 100% volt a halálozás (196-os izolátum:  $P=0,2004$ ; 27-es számú izolátum:  $P=0,1459$ ), a túlélési görbe meredek zuhanása jól reprezentálja az AMB terápia hatástalanságát (**13. ábra**).

A kelet-ázsiai izolátumokkal fertőzött csoportokban ezzel szemben az egyedek túlélése szignifikánsan javult az AMB terápia hatására (12373-es izolátum:  $P=0,0009$ ; 12373-as izolátum:  $P=0,0005$ ), fontos viszont megjegyeznünk, hogy a kezelt csoportok több egyedénél is ataxia és egyensúlyzavar jelei voltak megfigyelhetők. A 12372-es izolátummal fertőzött csoport nyolc túlélője közül három, a 12373-as izolátummal fertőzött csoportban pedig az öt túlélőből kettő mutatott ilyen jeleket. A 12372-es csoport 20. napi, valamint a 12373-as csoport 17. és 21. napon elpusztult egyedeinél szintén tapasztaltunk ilyen tüneteket, amelyek az elhullás előtt 2-3 nappal jelentkeztek (**13. ábra**). A két dél-afrikai kládból származó izolátummal fertőzött csoportnál az AMB terápia csak a 2-es törzssel fertőzött csoport esetén javította az egyedek túlélését ( $P=0,0189$ ), viszont a csoport 17. napján elhullott egyed szintén mutatott ataxiára utaló jegeket 2-3 nappal a pusztulása előtt (**13. ábra**).

A két vérből izolált dél-amerikai törzssel fertőzött csoport vizsgálata során az AMB terápia az I-156-os izolátummal fertőzött csoport egyedeinek a halálozását szignifikánsan csökkentette ( $P=0,0017$ ). A csoportban két ataxiás esetet tapasztaltunk, ezek az egyedek a kísérlet 10. és 12. napján pusztultak el (**13. ábra**).

A dél-amerikai környezeti izolátumokkal fertőzött csoportok túlélésére az AMB terápiának nem volt hatása, a csoportok egyedeinek az elhullása a fertőzést követő 3.-4. napon kezdődött és a kísérlet 7. napjára minden csoport exitált. A túlélési görbe meredek esése jól mutatja az AMB terápia eredménytelenségét ezekkel az izolátumokkal szemben (**13. ábra**).



**13. ábra.** Napi 1 mg/kg amphotericin B-vel kezelt neutropéniás, *Candida auris* izolátumokkal intravénásan oltott BALB/c egerek túlélése. A dél-ázsiai kládból 2 (A), a kelet ázsiai kládból 2 (B), a dél-afrikai kládból 2 (C) és a dél-amerikai kládból 4 (D és E) izolátumot vizsgáltunk a 21 napos időtartam alatt. A dél-

amerikai klád esetén két izolátum kórházi környezetből származik (**E**). Kék ellipszis jelezi azokat az egereket, amelyek haláluk előtt 2-3 nappal ataxia jeleit mutatták (a kelet-ázsiai klád mindkét izolátuma (**B**), a dél-afrikai kládból a 2-es (**C**) és a dél-amerikai kládból az I-156-os (**D**) izolátumokkal fertőzött egerek).

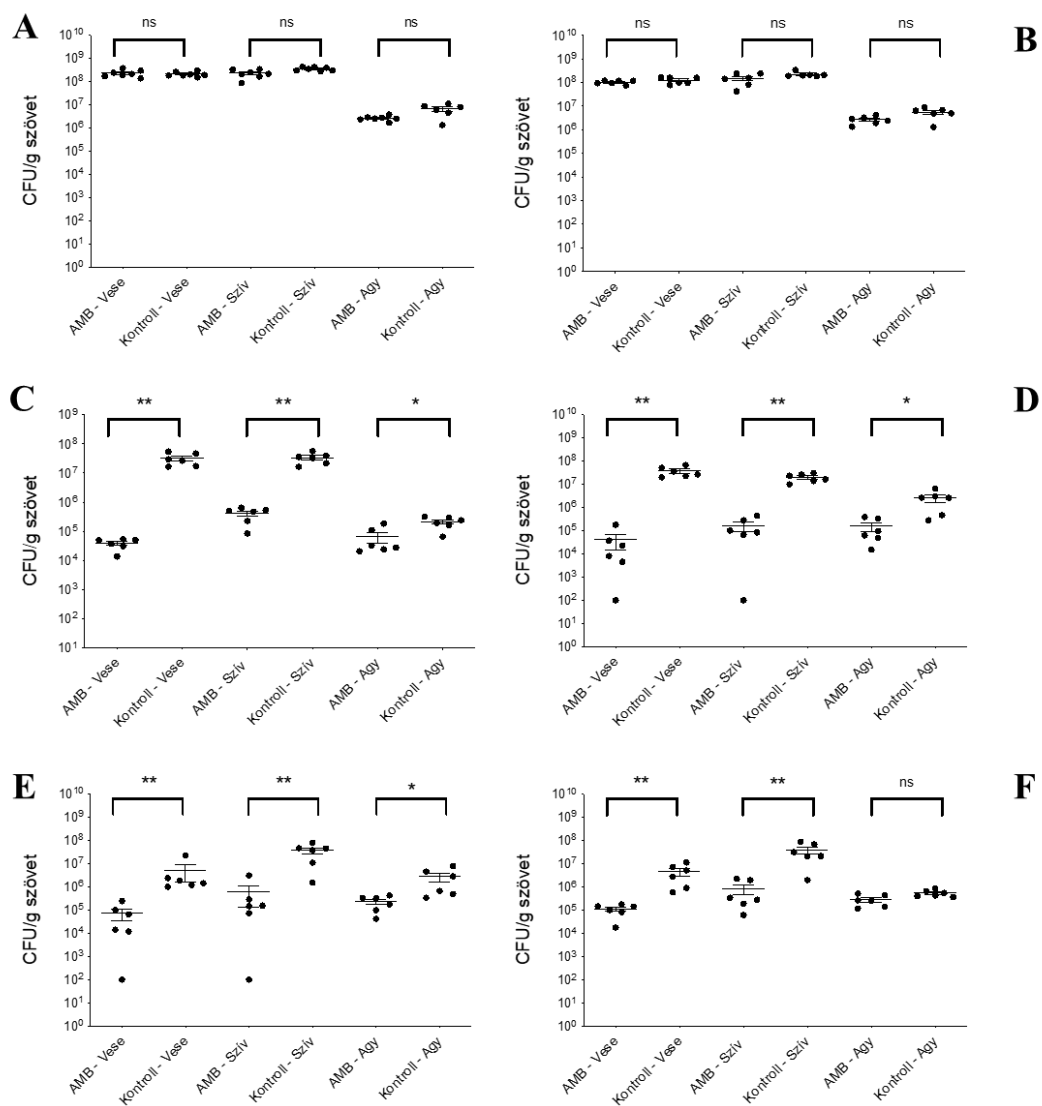
### **6.2.2. Amfotericin B *in vivo* hatékonysága a szervi perzisztencia alapján**

A szöveti perzisztencia vizsgálatok során az AMB terápia hatástalan volt a dél-ázsiai izolátumokkal fertőzött csoportok esetében, mivel a kezelt csoport szerveiből kitenyészett gombasejtek mennyisége egyik szervben sem mutatott csökkenést ( $P > 0,05$ ). A vese és a szív esetén  $\sim 10^8$  CFU/g, az agy esetében pedig  $\sim 10^6$  CFU/g értékeket határoztunk meg (**14. ábra**).

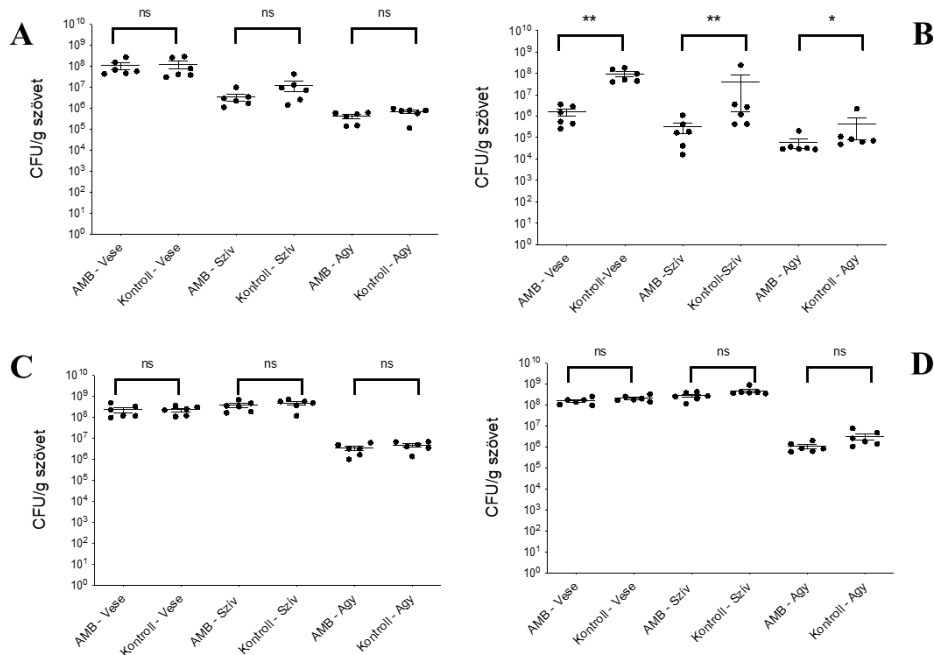
Szignifikáns sejtszám csökkenést tapasztaltunk viszont a kelet-ázsiai izolátumokkal fertőzött csoportok esetében, az AMB terápia csökkentette az agy ( $P < 0,05$ ), a vese ( $P < 0,01$ ) és a szív ( $P < 0,01$ ) szervtenyészetekből kinőtt gombasejtek számát. Mindkét kezelt csoport agy és szív szervtenyészetéből az átlagosan kitenyészett gomba mennyisége  $\sim 10^5$  CFU/g volt. A 12373-as izolátummal fertőzött csoport egyik egyedének vese és szív szervtenyészetei sterilitást mutattak (**14. ábra**).

Hasonló eredményeket tapasztaltunk a dél-afrikai klád izolátumaival fertőzött csoportok egyedeinél is, viszont a 204-es izolátummal fertőzött csoport esetében az AMB kezelés az agyban nem eredményezett szignifikáns csökkenést a gomba mennyiségében. A 2-es izolátummal fertőzött csoport egyik egyedénél a vese és a szív sterilitása volt megfigyelhető (**14. ábra**).

A dél-amerikai klád izolátumaival fertőzött csoportok szöveti perzisztencia vizsgálatának eredményei szoros egyezést mutattak a letalitási kísérletnél tapasztaltakkal. Az I-156-os izolátummal fertőzött csoport egyedeinél az AMB terápia mintegy két nagyságrendbeli csökkenést eredményezett a vese és a szív ( $P < 0,01$ ), valamint kisebb, mint egy nagyságrendbeli csökkenést az agy ( $P < 0,05$ ) szervtenyészetekből kinőtt gombasejtek számában. A másik három izolátum esetén a kezelt és kontroll csoportok eredményei között nem volt szignifikáns különbség, a szervekből kitenyészett gomba mennyisége közel hasonló volt (**15. ábra**).



**14. ábra.** Napi 1 mg/kg amfotericin B (AMB) hatása a belső szervekből (vesék, szív és agy) kitenyészett gombasejtek számára neutropéniás, BALB/c egerekben, a *C. auris* dél-ázsiai (**A**: 27-es, **B**: 196-os), kelet-ázsiai (**C**: 12372-es, **D**: 12373-as) és dél-afrikai (**E**: 2-es, **F**: 204-es számú) izolátumokkal intravénásan fertőzött egereknél. Az amfotericin B kezelés 24 órával az intravénás oltás után kezdődött és 5 napig tartott.  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*), és  $P < 0.001$  (\*\*\*)



**15. ábra.** Napi 1 mg/kg amfotericin B (AMB) hatása a belső szervekből (vesék, szív és agy) kitenyészett gombasejtek számára neutropeniás, BALB/c egerekben, a *C. auris* dél-amerikai (**A**: I-24-es, **B**: I-156-os, **C**: CDC B-13108-as és **D**: CDC B-13112-es) izolátumokkal intravénásan fertőzött egereknél. A CDC B-13108 és CDC B-13112-es izolátumok kórházi környezetből származtak. Az amfotericin B kezelés 24 órával az intravénás oltás után kezdődött és 5 napig tartott.  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*) és  $P < 0.001$  (\*\*\*)

### 6.2.3. Amfotericin B *in vivo* hatékonysága a szövettani vizsgálatok alapján

A fertőzést követő második napon felboncolt egyedek szövettani vizsgálata során megállapítható volt a vesék és a szív korai érintettsége mind a kezelt, mind pedig a kontroll csoport egyedeinek esetében, az agy szövetben viszont gombasejteket nem mutattunk ki. A fertőzött szervekben többnyire kisméretű gombasejt aggregátumokat tapasztaltunk a veseparenchimában és a miokardium arterioláiban (**18. ábra: A-C**).

A letalitási kísérletek 4. és 6. napjai között elhullt egyedek boncolása során kládtól függetlenül megfigyelhető volt a szívek és a vesék multifokális infiltrációja. A szívizom vizsgálata során Mallory-féle PTAH festéssel megállapítható volt a kontrakciós-sáv nekrozis jelensége. Az agy szövet vizsgálata során mind a nagyagy, mind pedig a kisagy érintettsége azonosítható volt (**16. ábra: A-O**).

A letalitási kísérlet során a kelet-ázsiai izolátumokkal (12372, 12373) fertőzött csoportok 17., 20. és 21. napján elhullt egyedek szövettani vizsgálata igazolta a nagy- és kisagyi érintettséget, ellenben a vesékben és a szívben gombasejteket nem azonosítottunk (**17. ábra: A-C**).

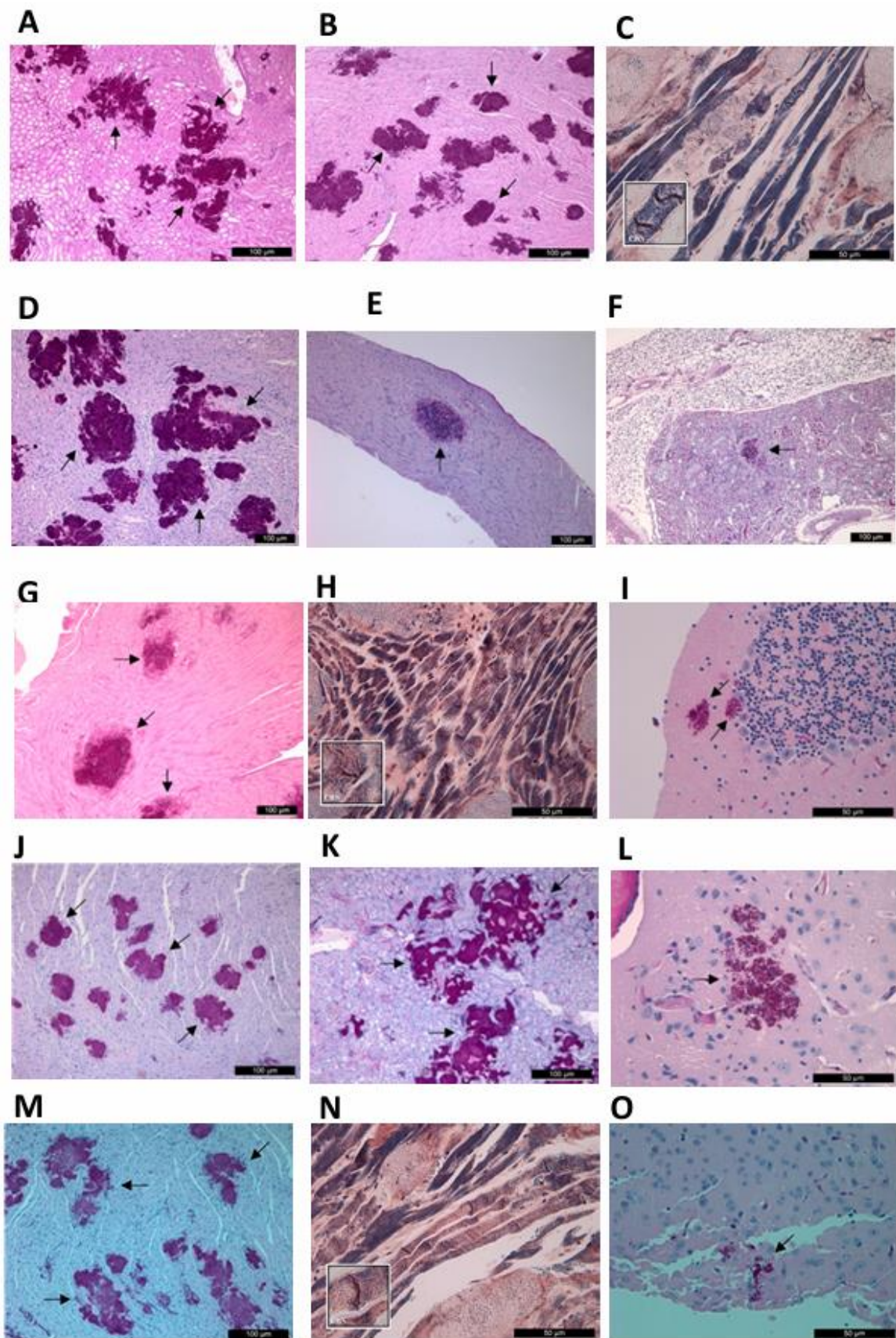
A **16. ábrán** láthatók az AMB-vel kezelt neutropéniás egerek szív, vese és agy szövettani képei PAS és Mallory-féle PTAH festéssel, amelyeket a letalitási kísérletek során a *C. auris* izolátumokkal történő intravénás fertőzést követően elhullottnak találtunk.

A 196-os izolátummal (dél-ázsiai klád) fertőzött egereknél, amelyek az 5. napon pusztultak el, a vesékben (**16/A**) nagy, multifokális gombasejt aggregátumok voltak megfigyelhetők, a parenchimában gombasejteket azonosítottunk, a tubuláris szövetben pedig nekrosis következett be, de a glomerulusok nem voltak fertőzöttek. A szívben (**16/B**) a *C. auris* nagy aggregátumokat képzett, ami a myociták koagulatív nekrosisát eredményezte. A Mallory-féle PTAH-festéssel minden esetben azonosítható volt a kontrakciós-sáv nekrosis (myofibrilláris degeneráció) (**16/C**).

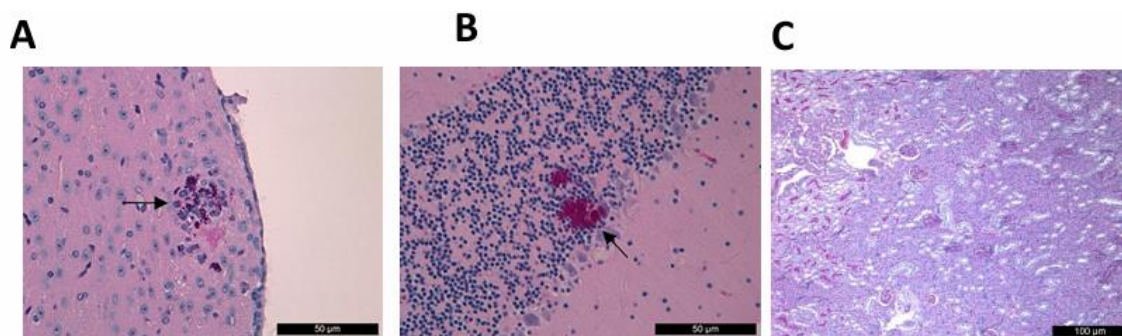
A 12372-es izolátummal (kelet-ázsiai klád) fertőzött egerek esetében, amelyek a 6. napon pusztultak el, a szívek vizsgálata során multifokális (**16/D**) vagy csak fokális (**16/E**) gombás infiltrátumokat találtunk. A vesékben (**16/F**) kis kiterjedésű sejtaggregátumok voltak láthatók.

A 204-es izolátummal (dél-afrikai klád) fertőzött egereknél, amelyek az 5. napon pusztultak el, a szívekben 4-5 aggregátum (**16/G**) volt kimutatható, a kontrakciós-sáv nekrosis jelensége itt is megfigyelhető volt (**16/H**). A kisagyban (**16/I**) egy nagyobb és egy kisebb PAS-pozitív sejtaggregátumot azonosítottunk. Az I-156-os izolátummal (dél-amerikai klád) fertőzött egerekben, amelyek az 5. napon pusztultak el, multifokális, nagyméretű aggregátumok voltak láthatók a szívben (**16/J**) és a vesében (**16/K**), az agyvelőben pedig nagyszámban azonosítottunk gombasejteket (**16/L**).

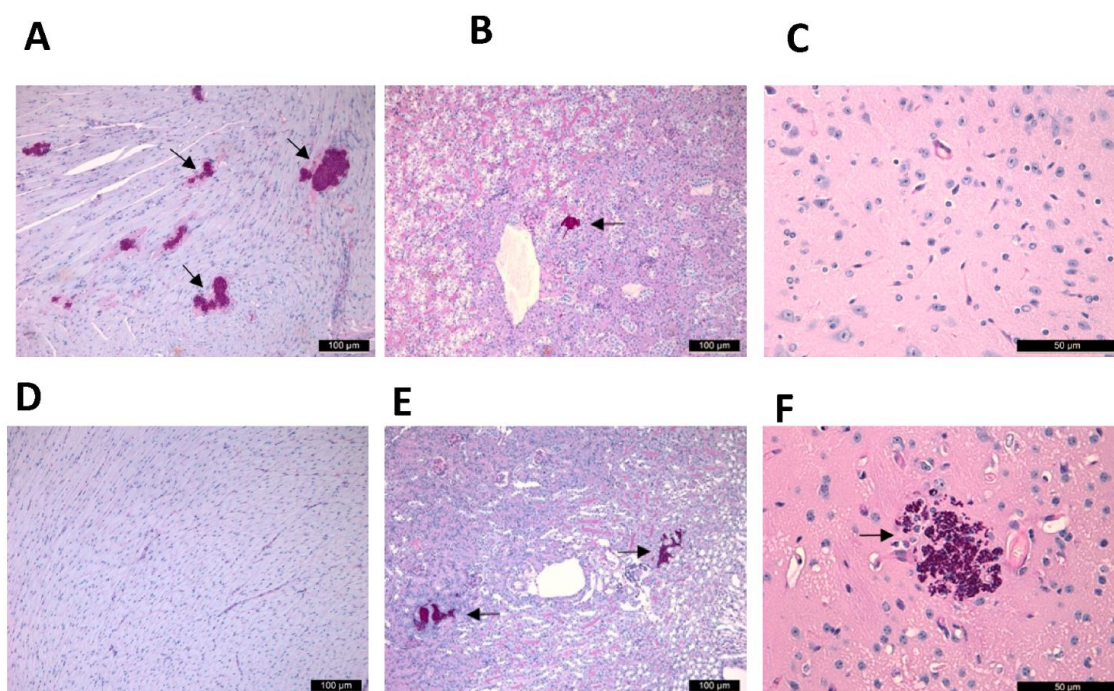
A CDC B-13108 izolátummal fertőzött egereknél, amelyek a 4. napon pusztultak el, a szívben kisebb-nagyobb multifokális infiltrátumokat (**16/M**) találtunk kontrakciós-sáv nekrozissal (**16/N**). Az agyvelőben (**16/O**) gombasejtek voltak láthatók.



**16. ábra.** Amfotericin B-vel kezelt neutropéniás egerek szív, vese és agy szövettani képei PAS és Mallory-féle PTAH festéssel. A gombasejteket, illetve sejtagregátumokat fekete nyilakkal jelöltük. Nagyítás: (A,B,D-G,J,K,M)  $\times 100$ , (C,H,I,L,N,O)  $\times 400$ .



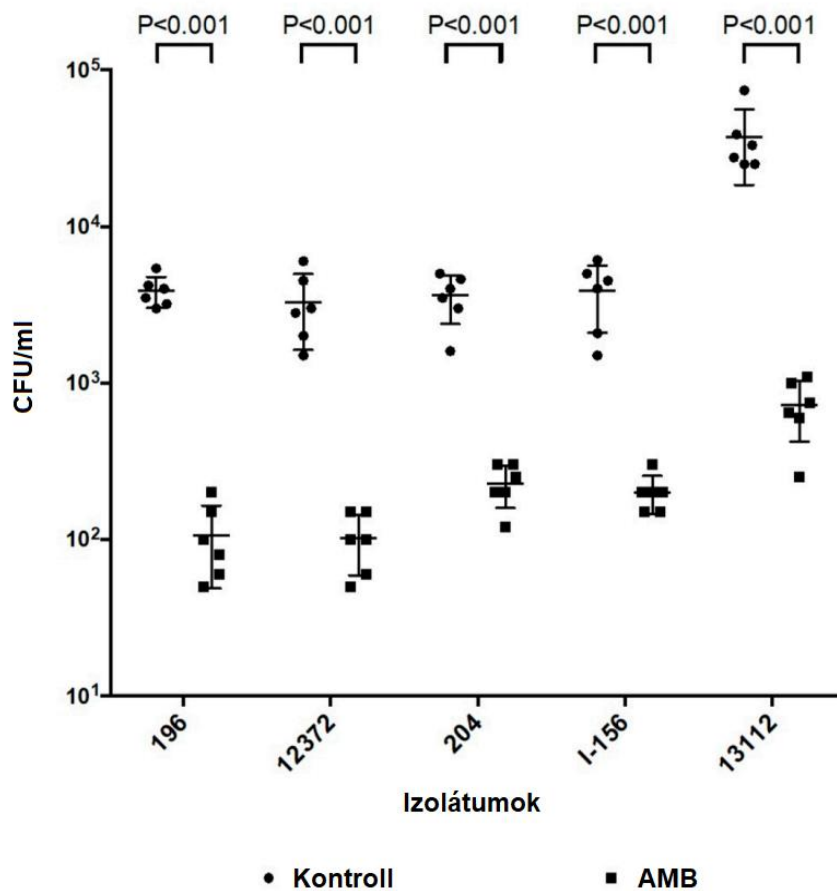
**17. ábra.** A nagyagy, a kisagy és a vese szövettani vizsgálata PAS festéssel. A szervek egy neutropéniás, AMB-vel kezelt, 12372-es izolátummal (kelet-ázsiai klád) fertőzött egerből származnak, amely a 20. napon elpusztult. A nagyagy (A) és a kisagy (B) gombasejteket tartalmazott, de a vesék (C) sterilek voltak, normál szöveti struktúrával, gombasejtek nélkül. A gombasejteket fekete nyilakkal jelöltük. Nagyítás:  $\times 100$ .



**18. ábra.** A szív, a vese és az agy szövettani vizsgálata PAS festéssel a szöveti perzisztencia kísérletből. Az I-156-os izolátummal (dél-amerikai klád) fertőzött, a 2. napon megölt és felboncolt neutropéniás eger szívében (A) és veséjében (B) kis gombasejt aggregátumok voltak láthatók, az agyban (C) azonban nem voltak gombasejtek kimutathatók. A szövettani eredmény függetlenül attól, hogy az egereket AMB-vel kezeltük-e vagy sem, a 2. napon minden izolátum és klád esetében azonos volt. A 12372-es izolátummal (kelet-ázsiai klád) fertőzött és 1 mg/kg AMB-vel kezelt eger esetében a 6. napon a szív normál szöveti struktúrát mutatott gombasejtek nélkül (D), de a vesében (E) és az agyban (F) kimutattunk gombasejteket. A gombasejteket fekete nyilakkal jelöltük. Nagyítás:  $\times 100$ .

#### 6.2.4. Amfotericin B *in vivo* hatékonysága a vizelettenyésztés alapján

A 196-os (dél-ázsiai klád), a 12372-es (kelet-ázsiai klád), a 204-es (dél-afrikai klád), az I-156-os (dél-amerikai kládból származó véráram izolátum) és a 13112-es (dél-amerikai kládból származó környezeti izolátum) izolátummal fertőzött kontroll csoportok egyedeinek vizelete  $3,2-5,4 \times 10^3$ ,  $2-6 \times 10^3$ ,  $1,6-4 \times 10^3$ ,  $1,08-6,1 \times 10^3$  és  $8,8 \times 10^3-7,4 \times 10^4$  CFU/ml *C. auris*-t tartalmazott. A két napos AMB kezelés (3. nap) átlagosan legalább 1 log CFU érték csökkenést eredményezett a kontroll csoport eredményeihez képest ( $p < 0,001$  minden esetben).



**19. ábra.** A két napos AMB kezelés hatása a vizeletből kitenyésztett gombasejtek számára a dél-ázsiai (196-os), a kelet-ázsiai (12372-es), a dél-afrikai (204-es) és a dél-amerikai (I-156-os, CDC B-13112-es) *C. auris* izolátumokkal intravénásan fertőzött neutropéniás, BALB/c egereknél. A CDC B-13112-es izolátum kórházi környezetből származott. Az AMB kezelés 24 órával az intravénás oltás után kezdődött.

## 7. Megbeszélés

### 7.1. *Candida auris* és *Candida albicans* virulenciájának összehasonlító vizsgálata neutropeniás egérmodellben

A *C. auris* fertőzés leggyakoribb klinikai megjelenési formája az intenzív osztályokon kezelt magas kockázatú betegek körében jelentkező candidémia. A fő kockázati tényezők a diabetes mellitus, a kardiovaszkuláris és gasztrointesztinális betegségek, a hematológiai malignitások és a kortikoszteroid kezelés (Lockhart és mtsai. 2016; Sekyere és mtsai. 2018; Armstrong és mtsai. 2016; Rudramurthy és mtsai. 2017). Érdekes módon a neutropénia nem tekinthető az invazív *C. auris* fertőzés kiemelt kockázati tényezőjének. Ez a klinikai tapasztalat talán összefügg azzal az *in vitro* megállapítással, hogy a *C. auris* a *C. albicans*-hoz képest hatékonyabban kerüli ki a neutrofilek bekebelezését és a neutrofilek által termelt extracelluláris csapdákat (Johnson és mtsai. 2018). Chowdhary és munkatársai azonban 12 *C. auris* candidémiás beteg közül 6-nál jelentettek neutropeniát (Chowdhary és mtsai. 2013). A candidémia a látszólag megfelelő célzott gombaellenes terápia ellenére gyakran perzisztál; szeptikus áttétes szövődményekkel (pl. spondylodiscitis, endo- és pericarditis) is gyakran találkozunk. A vesék is gyakran érintettek a patogenezisben, mind a candidémiával járó, mind a candidémia nélküli esetekben (Chowdhary és mtsai. 2018; Morales-López és mtsai. 2017; Adams és mtsai. 2018; Vallabhaneni és mtsai. 2017). A *C. auris* candidémia esetén a kórházi halálozási arány elérheti a 68-80%-ot (Lockhart és mtsai. 2016; Vallabhaneni és mtsai. 2017). A *C. auris* okozta mortalitást nehéz pontosan meghatározni a betegek súlyos alapbetegségei miatt; a korlátozottan rendelkezésre álló becslések alapján ez az érték 23% és 67% közé tehető (Kim és mtsai. 2024).

A kládspecifikus halálozásra vonatkozó adatok hiányosak. A *C. auris* candidémia első bejelentett eseteiben a kelet-ázsiai kláddal fertőzött három beteg közül kettő meghalt Koreában és a FLU és AMB kezelés ellenére perzisztáló candidémiát tapasztaltak esetükben (Lee és mtsai. 2011). Lockhart és munkatársai 47-72%-os, 60%-os és 33%-os halálozási arányról számoltak be dél-ázsiai, dél-amerikai és dél-afrikai kládok esetében (Lockhart és mtsai. 2016).

A neutropeniás egérmodellben végzett túlélési kísérleteink eredményei összhangban voltak más kutatócsoportok eredményeivel, amelyek szerint a *C. auris* kládtól függetlenül kevésbé virulens, mint a *C. albicans* (Wang és mtsai. 2018; Ben-Ami és mtsai. 2017; Torres és mtsai. 2020). Vizsgálatunkban a négy *C. auris* klád virulenciájának rangsora a

következő volt: dél-amerikai klád > dél-ázsiai klád > dél-afrikai klád = kelet-ázsiai klád (5. ábra). A dél-ázsiai kláddal kapott letalitási eredményeink (50-100%-os letalitás) jól korrelálnak a korábban neutropeniás BALB/c vagy CD-1 egerek esetében közölt eredményekkel (40-100%-os letalitás), azonos vagy magasabb ( $10^7$ - $10^8$  CFU/egér) fertőző dózisok mellett (Torres és mtsai. 2020; Singh és mtsai. 2019). A dél-afrikai kláddal végzett hasonló vizsgálatok hiánya kizárja az eredményeinkkel való összehasonlítást. Megerősítettük azonban azt a *G. mellonella* modellben végzett korábbi megfigyelést, hogy az aggregáló dél-afrikai *C. auris* izolátumok kevésbé virulensek, mint a nem-aggregáló dél-afrikai izolátumok (Borman és mtsai. 2016). Ezen túlmenően gyakorlatilag minden klád esetében jelentős különbségeket találtunk az azonos kládba tartozó izolátumok virulenciájában. Ezek az eredmények összhangban vannak a korábbi *in vitro* eredményekkel, amelyek szerint a *C. auris* izolátumok számos virulenciafaktort termelhetnek törzsfüggő módon, de kisebb mértékben, mint a *C. albicans* (Sekyere és mtsai. 2018; Larkin és mtsai. 2017). Érdekes megfigyelni, hogy a véráramfertőzésből és a kórházi környezetből származó dél-amerikai kládba tartozó *C. auris* izolátumok a 21. napon nagyon hasonló halálozási arányt produkáltak (100% és 90%). Ez rávilágít arra, hogy a *C. auris* a virulenciáját képes hosszú ideig megőrizni a kórházi környezetben, és ezek az izolátumok potenciális kolonizációs és fertőzési forrást jelentenek a magas kockázatú betegek számára (Lockhart és mtsai. 2016; Sekyere és mtsai. 2018; Armstrong és mtsai. 2016; Ruiz-Gaitán és mtsai. 2018; Al Maani és mtsai. 2019).

A magas szöveti perzisztencia kládtól függetlenül alátámasztotta a szövettani eredményeinket; a hatodik napon boncolt egyedek szívében, veséjében és májában minden esetben multifokális, nagyméretű gombasejt aggregátumokat találtunk, ellenben a lépben csak különálló gombasejt csoportok voltak megfigyelhetők (11. ábra). Érdekes módon ezeket az elváltozásokat mind az aggregatív, mind a nem-aggregatív izolátumok esetében tapasztaltuk, ami arra utal, hogy mindkét fenotípus hasonlóan viselkedik *in vivo* környezetben. Ezek a nagyméretű gombasejt aggregátumok a szövetekben megvédhetik a gombát a hatékony immunválasztól, és elősegíthetik a gomba perzisztenciáját és szaporodását (Sekyere és mtsai. 2018; Borman és mtsai. 2016; Alfouzan és mtsai. 2019). Továbbá nem zárható ki az sem, hogy ezeknek a nagy szöveti aggregátumoknak a homogenizálása nem volt tökéletesen sikeres, és a homogenizálás ellenére néhány sejt aggregált maradt, ami a CFU-értékek alulbecsülését eredményezhette. Ez magyarázhatja,

hogy egyes izolátumok (pl. a dél-ázsiai kládból származó 164-es izolátum) miért mutattak váratlanul kevesebb CFU-t a hatodik napon, mint a második napon.

A miokardiumban az endokardium érintettsége nélkül kialakuló nagy, multifokális fungális léziók hematogén eredetre utalnak; a fertőzést követő első napon valamennyi *C. auris* izolátummal fertőzött csoport esetében megfigyelhetők voltak a koszorúerekben megtapadó gombasejt csoportok (**12. ábra: C**). Eredményeink összhangban vannak azon tanulmányok eredményeivel, ahol a dél-amerikai és dél-ázsiai kládból származó *C. auris* izolátumokkal fertőzött BALB/c, A/J, neutrofil elasztázhányos, C57BL/6 neutropeniás és nem neutropeniás egermodell kísérletekben magas gombaterhelést ( $\geq 10^5$  CFU/g) figyeltek meg a szívizomban (Torres és mtsai. 2020; Xin és mtsai. 2019). Ezzel szemben a virulensebb *C. albicans* esetében endokardiális érintettséget találtunk, a miokardiális érintettség pedig elsősorban szubendokardiális volt, ami arra utal, hogy a gombasejtek az endokardiumból kiindulva hatoltak be a miokardiumba.

Annak ellenére, hogy a szívben már a második napon is nagy volt a gombaterhelés ( $\geq 5,2 \times 10^5$  CFU/g), a dél-afrikai, kelet-ázsiai és dél-ázsiai kládból származó kevésbé virulens izolátumok esetében nem volt megfigyelhető a fokozott korai halálozás. A súlyos miokardiális gombaterhelés azonban a szívizomsejtek irreverzibilis károsodását eredményezte, amint azt a kontrakciós-sáv nekrozis megjelenése is jelezte (**12. ábra: B**), amelyet mind a látszólag egészségesnek tűnő boncolt, mind pedig a frissen elhullott példányok esetében tapasztaltunk. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy *C. auris* candidémia diagnózisának megállapítása és kezelésének késedelme növelheti a fertőzés által kiváltott szívizomeléggtelenség kialakulásának esélyét és az annak következményeként fellépő hirtelen halálozást.

A vese és/vagy a szív magas gombaterhelése gyakran társul az agy és a tüdő nagy gombaterhelésével, amint arról mind az immunkompetens, mind a neutropeniás egerek esetében beszámoltak. Singh és munkatársai egyszerre észlelték a vesék ( $2 \times 10^8$  CFU/g) és az agy ( $2 \times 10^6$  CFU/g) magas szöveti terhelést. Érdekes módon az agyban talált *C. auris* sejtek elsősorban a kapillárisokban lokalizálódtak, nem pedig magában az agyszövetben. A *Candida* pneumonia az invazív *Candida* fertőzések ritka megnyilvánulása az emberben, de immunkompetens ICR és BALB/c egerekben a magasabb fertőző dózisok ( $\geq 10^7$  CFU/g)  $10^3$ - $10^5$  CFU/g tüdőszöveti terhelést eredményeztek (Fakhim és mtsai. 2018; Wang és mtsai. 2018). Bár egermodellünkben nem vizsgáltuk az agy és a tüdő gombaterhelését, a szív és a vese magas gombaterhelése

alapján a központi idegrendszer és a tüdő inváziója is elképzelhető. Meningeális érintettségre utaló jeleket azonban nem tapasztaltunk (Torres és mtsai. 2020).

Nagy gombaterhelést figyeltünk meg a szervekben, különösen a szívizomban, ami megerősíti azt a feltételezésünket, hogy a szív az egyik fő célpont a *C. auris* fertőzés eseteiben. Azonban más szervek, különösen a vese elégtelensége is hozzájárulhat a halálozáshoz. Az azonos kládba tartozó izolátumok különbséget mutattak a virulenciában; a dél-amerikai klád jelentősen magasabb virulenciája egyértelműen kimutatható volt mind a véráramból, mind pedig a kórházi környezetből származó izolátumok esetében.

## **7.2. Amfotericin B *in vivo* hatékonysága *Candida auris* ellen**

A *Candida* fertőzések között az utóbbi években növekvő számban jelentek meg a nem-albicans fajok által okozott megbetegedések, ami aggodalomra adhat okot azok nagyobb antifungális szer rezisztenciája miatt (Esmailzadeh és mtsai. 2018; Zarrinfar és mtsai. 2021; Arastehfar és mtsai. 2019). Neutropeniás egérmódelünkben a napi 1 mg/kg AMB klád- és izolátumfüggő aktivitást mutatott a *C. auris* ellen. Az intravénás fertőzés gyorsan átterjedt a belső szervekre, beleértve a központi idegrendszert is; az AMB kezelés csak a kelet-ázsiai klád izolátumai, valamint egy dél-afrikai és egy dél-amerikai kládból származó izolátum esetében növelte jelentősen az egerek túlélési arányát (**13. ábra: B-D**). A túlélési adatok összhangban voltak a szervi perzisztencia vizsgálatok eredményeivel. Az egyébként kevésbé virulens kelet-ázsiai és dél-afrikai kládok esetében az ötnapos AMB kezelés képes volt csökkenteni a szív és a vese szöveti gombaterhelését (**14. ábra: C-F**), amit a szövettani vizsgálatok is alátámasztottak, ami az egerek hosszabb túléléséhez vezetett (**13. ábra: B-C**). Az AMB hatástalan volt a központi idegrendszer sterilizálása tekintetében, amint azt a hatodik napon tapasztalt magas (legalább  $10^5$  CFU/g) gombaterhelés, valamint a letalitási kísérletek során megfigyelt idegrendszeri tünetek (torticollis, ataxia) megjelenése jelzi. Érdekes megfigyelés, hogy a legvirulensebb dél-ázsiai és dél-amerikai kládok esetében a központi idegrendszeri érintettség klinikai tünetei ritkán vagy egyáltalán nem jelentkeztek az AMB-vel kezelt egereknél, mivel a súlyos szívizomkárosodás még azelőtt az egyedek korai halálához vezetett, hogy a központi idegrendszeri érintettség jelei kialakulhattak volna. Némi aggodalomra adhat okot az a tény, hogy a környezeti izolátumokkal fertőzött egerek rosszul reagáltak az AMB kezelésre.

Eredményeink összhangban vannak más tanulmányok eredményeivel. Lepak és munkatársai úgy találták, hogy 1,25, 5 és 20 mg/kg AMB, 2 órával a fertőzést követően alkalmazva fungisztikus hatású volt a vese gombaterhelését vizsgáló neutropéniás egérmodell kísérlet során alkalmazott 9 *C. auris* izolátumból 8 ellen (amelyek a négy fő kládból származtak) (Lepak és mtsai. 2017). Az AMB a legjobb eredményt (több mint 1 log CFU csökkenést) egyetlen japán izolátummal (kelet-ázsiai klád) szemben mutatta. 2021-ben Herrada és munkatársai az AMB hatékonyságát egy darab *C. auris* izolátummal szemben határozták meg letalitási és a vese szervi perzisztencia vizsgálataikban. Úgy találták, hogy az AMB-vel összehasonlított antifungális szerek (liposzómás AMB, micafungin, rezafungin) szignifikánsan jobb aktivitást mutattak a neutropéniás egérmodellben, mint a hagyományos AMB 2 órával a fertőzést követően alkalmazva (Herrada és mtsai. 2021; Hager és mtsai. 2018). Nem vizsgálták azonban az AMB hatékonyságát a *C. auris* által okozott fungális eredetű myocarditis és a központi idegrendszeri fertőzés kezelésének tekintetében. Az olyan vizsgálatok hiánya, ami az AMB hatékonyságát a négy fő *C. auris* kláddal szemben vizsgálta korábban, kizárja annak lehetőségét, hogy az eredményeinket más szerzők eredményeivel összevethessük. Az összehasonlítás másik korlátja, hogy a szervi gombaterhelést a vesében, a szívben és az agyban vizsgáltuk. Más szerzők úgy találták, hogy az intravénás *C. auris* fertőzés neutropéniás egerekben magas szöveti gombaterhelést eredményezett a tüdőben, a cecumban, a méhben és a gyomorban (Pichowicz és mtsai. 2022). Korábbi vizsgálatok azonban azt mutatták, hogy a *C. auris* okozta invazív fertőzéseknél a szív és a vesék a fő célpontok, a központi idegrendszer érintettségével együtt (Forgács és mtsai. 2020; Torres és mtsai. 2020; Singh és mtsai. 2019; Xin és mtsai. 2019); ezeknek a szerveknek az érintettsége, kiemelt tekintettel a szívre, az egerek elhalásának az elsődleges oka (Forgács és mtsai. 2020). Tanulmányunk jelentősége abban áll, hogy az AMB *in vivo* hatékonyságát a négy fő kláddal szemben vizsgáltuk mind letalitási, mind szöveti perzisztencia kísérletekben, valamint a vizeletben lévő CFU-ra gyakorolt hatást két napos AMB kezelést követően. Ezenkívül az elvégzett szövettani vizsgálatoknak fontos szerepe volt az invazív *C. auris* fertőzések patogenezisének korai szakaszának megismerésében. Az iráni és a szingapúri kládot azonban nem vizsgáltuk. A candidémia a *C. auris* fertőzések leggyakoribb klinikai megjelenési formája és felismerése azonnali antifungális terápiát tesz szükségessé (echinocandinokkal vagy AMB-vel) (Sekyere és mtsai. 2018; Lockhart és mtsai. 2016; Armstrong és mtsai. 2016;

Rudramurthy és mtsai. 2017; Chowdhary és mtsai. 2018; Chowdhary és mtsai. 2020; Villanueva-Lozano és mtsai. 2021). Az echinocandinokkal és az AMB-vel végzett kezelések sikertelensége a perzisztáló vagy rekurrens candidémiában szenvedő betegeknél a gombasejtek elégtelen eliminálásának következménye (Ruiz-Gaitán és mtsai. 2018; Alatoon és mtsai. 2018). A metasztatikus disszemináció tovább nehezíti a fertőzés teljes eradikációját, ami akár endophthalmitishez, spondylodiscitishez, endo-/myocarditishez is vezethet (Ruiz-Gaitán és mtsai. 2018). Ugyan a központi idegrendszeri érintettsége ritka, idegsebészeti beavatkozásokon átesett vagy szubarachnoidális vérzéssel kezelt felnőtt betegeknél megfigyeltek ilyen eseteket (Khatamzas és mtsai. 2019; Singhal és mtsai. 2018). Egy iráni csecsemőnél meningitis alakult ki egy, a dél-ázsiai kládba tartozó *C. auris* izolátum miatt (Mirhendi és mtsai. 2022).

Eredményeink határozottan arra engednek következtetni, hogy mind az AMB-vel kezelt, mind pedig a kezeletlen kontroll egerek esetében a szívizom károsodása tehető elsődlegesen felelőssé az egyedek halálozásáért (**16. ábra: C, H, N**). A fertőzést követő második napon felboncolt egyedek szövettani vizsgálatai (**18. ábra: A-C**) megerősítették korábbi megfigyeléseinket, miszerint a *C. auris* sejtek intravénás adagolása a szívben és a vesében a fertőzést követően már 2 nappal magas szöveti gombaterhelést eredményezett (Forgács és mtsai. 2020). Az AMB kezelés a virulensebb dél-ázsiai és dél-amerikai kládok esetében nem tudta sem megszüntetni, sem pedig csökkenteni a gombaterhelést a vizsgált szervekben, amint azt a 3-4. napon elpusztult egerek szövettani vizsgálatai kimutatták (kontrakciós-sáv nekrozis megjelenése a szívekben, valamint kiterjedt fungális infiltráció a vesékben és az agyban) (**16. ábra: A-C, J-O**). Ugyan mi nem mértük az AMB koncentrációját a szérumban, a szívben, a vesében és az agyban, ami a vizsgálat további korlátjának tekinthető, viszont más szerzők 0,1 mg/l, 0,7 µg/g és 0,3 µg/g AMB koncentrációt találtak az egerek szérumában, szívében és veséjében 4 órával az 1 mg/kg AMB kezelést követően (Shadkchan és mtsai. 2003). Mindezek mellett az AMB erősen kötődik a fehérjékhez, ami tovább csökkenti a szabad, tehát biológiailag aktív AMB koncentrációját a szérumban és a szövetekben, ami magyarázatot ad az AMB gyenge *in vivo* hatékonyságára (Lewis és mtsai. 2003). Ez különösen szembevetendő a dél-amerikai kládba tartozó környezeti izolátumok ellen, amelyek a legkevésbé érzékeny izolátumok a letalitási vizsgálatokban (Papp és mtsai. 2021). Ezzel szemben az AMB kezelés a hatodik napra jelentősen csökkentette a kelet-ázsiai és dél-afrikai kládból származó, kevésbé virulens izolátumokkal fertőzött egerek vese- és szívsvöveti terhelését;

az egerek többsége 21 nap után is életben maradt még úgy is, hogy ha a meningitis klinikai jeleit mutatta. Fontos megemlíteni, hogy az ezekben a csoportokban elhullt egyedek szövettani vizsgálatai során sem a szívben, sem pedig a vesében nem voltak gombasejtek (**17. ábra: C**), de a nagyagyban (**17. ábra: A**) és a kisagyban (**17. ábra: B**) mindig fellelhetőek voltak. A szövettani eredményeink arra utalnak, hogy a fertőzést követően legalább 4 nap szükséges ahhoz, hogy a *C. auris* behatoljon a központi idegrendszerbe (**16. ábra: O**). Singh és munkatársainak tanulmányával ellentétben, a gombasejteket az agyszövetben azonosítottuk, nem pedig a kapillárisokban (Singh és mtsai. 2019). Ezek a kládspecifikus adatok arra utalnak, hogy az AMB koncentrációja a kísérlet első 6 napján elég magas volt ahhoz, hogy a gombasejtek számát a szívben, a vesékben (**14.-15. ábra**) és a vizeletben (**19. ábra**) csökkentse, vagy adott esetben teljes mértékben eliminálja azokat, de a központi idegrendszerből (**18. ábra: F**) nem (Lewis és mtsai. 2003; Dudiuk és mtsai. 2019; Shadkchan és mtsai. 2003; Caballero és mtsai. 2021). A betegekből izolált *C. auris* törzsek genetikailag azonosak a kórházi felületekről és az egészségügyi dolgozókról származó törzsekkel, ami arra utal, hogy a *C. auris* forrása a kórházi környezet vagy az egészségügyi dolgozók lehetnek (Armstrong és mtsai. 2016). A legújabb adatok megerősítették a *C. auris* környezeti izolátumainak fontosságát, mivel Arora és munkatársai Indiában egy homokos tengerpartról és egy árapály mocsárból is izolálták a *C. auris*-t. Ezek a környezeti törzsek genetikailag közel álltak az Indiából származó klinikai izolátumokhoz (dél-ázsiai klád), és egy izolátum kivételével mind multidrog-rezisztenciát mutattak (Arora és mtsai. 2021). Ezen túlmenően izoláltak *C. auris*-t tárolt almák felületéről is; ezek a törzsek szoros rokonságban álltak az indiai betegekből, kórházakból származó törzsekkel, valamint a világ más részeiről származó klinikai törzsekkel (dél-ázsiai klád) (Yadav és mtsai. 2022). Mivel a kórházi környezeti izolátumok a magas kockázatú betegek fertőzésének elsődleges forrásai lehetnek, ezért ezeknek az izolátumoknak az antifungális szer érzékenységének meghatározása kiemelten fontos. Figyelemre méltó, hogy a napi 1 mg/kg dózisú AMB teljesen hatástalan volt a két kolumbiai környezeti izolátummal (dél-amerikai klád) szemben a neutropeniás egérmodellünkben, ami jelzés értékű arra nézve, hogy ezek a környezeti törzsek komoly terápiás kihívást jelenthetnek a klinikai gyakorlatban.

Az AMB korábban jelentett gyenge *in vitro* ölü hatását *in vivo* modellünkben is megerősítettük (Papp és mtsai. 2021; Dudiuk és mtsai. 2019), ami ajánlatossá teszi, hogy a *C. auris* candidémia alatt és után a klinikusok különböző képalkotó eljárásokkal

(ultrahang, komputertomográfia) rendszeresen ellenőrizték a belső szerveket (szív, vese, tüdő stb.) a disszeminált fertőzés jeleinek korai felismerése érdekében. A rutin vizelettenyésztés minden klinikai helyzetben hasznosnak tűnik, amikor az invazív *C. auris* fertőzés gyanúja merül fel, mivel ebben a vizsgálatunkban a vizelet 3 nappal a fertőzést követően pozitív volt. A *C. auris*-ra pozitív vizelettenyésztés azonban a periurethralis régióból származó fertőzés közvetlen következménye is lehet, ezért az ismételt vér- és vizelettenyésztés segíthet különbséget tenni a kontamináció és a candiduria között. A tartós vagy visszatérő candidémia a gombaellenes szerek gyenge ölő hatása miatt növeli a szív-, a szem- vagy a központi idegrendszeri fertőzés kockázatát, ami további szövődményekhez vezet (Rudramurthy és mtsai. 2017; Chowdhary és mtsai. 2018; Chowdhary és mtsai. 2020; Villanueva-Lozano és mtsai. 2021; Ruiz-Gaitán és mtsai. 2018; Alatoon és mtsai. 2018; Khatamzas és mtsai. 2019; Singhal és mtsai. 2018; Mirhendi és mtsai. 2022; Hopster és mtsai. 1996). Mivel bizonyos klinikai helyzetekben (pl. újszülöttek és 2 hónaposnál fiatalabb csecsemők, meningitis, endophthalmitis, húgyúti fertőzések) még mindig az AMB-dezoxikolát az első terápiás választás, ezért a klinikusoknak tisztában kell lenniük azzal, hogy a hagyományos AMB vagy akár az echinocandinok normál dózisú terápiája nem elégséges a gomba elpusztításához. Az echinocandinokkal vagy a lipid-asszociált AMB-vel alkalmazott nagyobb napi dózisok a candidémia során megelőzhetik ezeket a szövődményeket (meningitis, endophthalmitis és endo-/myocarditis). Az AMB és az echinocandinok kombinációja gyakran eredményezte a *C. auris* teljes eliminálását, még a központi idegrendszerből is (Chowdhary és mtsai. 2020; Khatamzas és mtsai. 2019; Singhal és mtsai. 2018; Mirhendi és mtsai. 2022). Az AMB kezelést azonban korlátozza az infúzióval összefüggő akut toxicitás (azaz mellkasi fájdalom, láz és hypoxia) és a dózisfüggő nefrotoxicitás (azaz veseelégtelenség, azotémia és hypokalaemia) (Lewis és mtsai. 2003).

## 8. Összefoglalás

Globális terjedésének köszönhetően a 2010-es évek végére több kontinensen jegyeztek a *C. auris*-hoz, ehhez a multidrog-rezisztens oportunistá kórokozóhoz köthető kórházi járványokat. A rendelkezésre álló adatok alapján az echinocandinok az elsődlegesen választandó antifungális szerek invazív *C. auris* fertőzés esetén, de még a megfelelő terápia mellett is a mortalitás 60%. Napjainkban a *C. auris* elsődleges fontosságú kórokozónak számít a WHO által közölt lista alapján.

Doktori projektem első célja az volt, hogy meghatározzuk a rendelkezésünkre álló négy földrajzi kládból származó *C. auris* klinikai izolátumok *in vivo* virulenciáját neutropeniás egérmodellben, a nyert adatokat pedig összehasonlítottuk a kontrollként alkalmazott *C. albicans* törzsek eredményeivel. A második cél az AMB *in vivo* gombaellenes hatásának vizsgálata volt a *C. auris* ellen. Az általunk meghatározott célok vizsgálatára túlélési kísérleteket végeztünk, szervtenyésztés útján meghatároztuk szöveti gombateher mértékét, valamint szövettani vizsgálatok segítségével jellemeztük a szöveti invázó hisztopatológiai sajátosságait.

A virulenciával kapcsolatos kísérletek során a túlélési kísérlet 21. napján a legmagasabb mortalitást a dél-amerikai klád esetében figyeltük meg (96%), amelyet a dél-ázsiai (80%), dél-afrikai (45%) és kelet-ázsiai (44%) kládok követtek. Kládtól függetlenül a *C. auris* törzsek kevésbé bizonyultak virulensnek, mint a *C. albicans*. A szöveti perzisztencia vizsgálat eredményei szoros korrelációt mutattak a letalitással. A szövettani vizsgálatok során a szívben, a vesében és a májban a gombasejtek nagyméretű aggregátumait tapasztaltuk, kládtól függetlenül a szív és a vese voltak a legsúlyosabban érintett szervek. Az AMB *in vivo* antifungális hatásával kapcsolatos kísérletekben a napi 1 mg/kg dózisú AMB csak a kevésbé virulens és *in vitro* AMB-re érzékenyebb kelet-ázsiai és dél-afrikai kládok esetében növelte a túlélési arányt és csökkentette a szövetek gombaterhelését. A többi kláddal szemben azonban az AMB hatékonysága megkérdőjelezhető. A szöveti vizsgálatok alapján a *C. auris* a korai AMB terápia ellenére is képes behatolni a szívbe, a vesékbe és a központi idegrendszerbe.

Összefoglalva, eredményeink azt mutatják, hogy invazív *C. auris* fertőzés gyanúja esetén a lehető leghamarabb meg kell kezdeni a napi nagy dózisú echinocandin vagy AMB terápiát, hogy megóvjuk a betegeket a fungális myocarditis vagy meningitis súlyos következményeitől.

## 9. Summary

Due to its global spread, hospital outbreaks linked to *Candida auris*, this multidrug-resistant opportunistic pathogen, were recorded on several continents by the late 2010s. The available data suggest that echinocandins are the antifungal agents of choice for invasive *C. auris* infection, but even with appropriate therapy, mortality is 60%. Today, *C. auris* is considered a priority pathogen according to the WHO list.

The first aim of my PhD project was to determine the *in vivo* virulence of *C. auris* clinical isolates from the four available geographical clades in a neutropenic mouse model and to compare the data with the results obtained with *C. albicans* strains used as controls. While the second objective was to investigate the *in vivo* antifungal activity of amphotericin B against *C. auris*. To test our objectives, we performed survival experiments, determined the extent of fungal burden by organ culture, and characterized the histopathological characteristics of the tissue invasion by histopathological examination.

In the virulence experiments, the highest mortality was observed in the South American clade (96%) on day 21 of the survival experiment, followed by the South Asian (80%), South African (45%) and East Asian (44%) clades. Regardless of clade, *C. auris* strains were found to be less virulent than *C. albicans*. Tissue fungal burden examination results showed a strong correlation with lethality. Histopathological examination revealed large aggregates of fungal cells in the heart, kidney and liver, with the heart and kidney being the most severely affected organs, irrespective of clade. In experiments on the *in vivo* antifungal activity of amphotericin B, AMB at a dose of 1 mg/kg/day increased survival and reduced tissue fungal burden only in the less virulent and more AMB-sensitive *in vitro* East Asian and South African clades. However, the effectiveness of AMB against other clades is questionable. Tissue examinations suggest that *C. auris* can invade the heart, kidneys and central nervous system despite early AMB therapy.

In summary, our results show that in cases of suspected invasive *C. auris* infection, daily high-dose echinocandin or AMB therapy should be started as soon as possible to protect patients from the serious consequences of fungal myocarditis or meningitis.

## 10. Irodalomjegyzék

1. **Adams E**, Quinn M, Tsay S, et al. *Candida auris* in Healthcare Facilities, New York, USA, 2013-2017. *Emerg Infect Dis.* 2018;24:1816–24.
2. **Ahmad S**, Alfouzan W. *Candida auris*: Epidemiology, Diagnosis, Pathogenesis, Antifungal Susceptibility, and Infection Control Measures to Combat the Spread of Infections in Healthcare Facilities. *Microorganisms.* 2021;9:807.
3. **Alatoom A**, Sartawi M, Lawlor K, AbdelWareth L, Thomsen J, Nusair A, Mirza I. Persistent candidemia despite appropriate fungal therapy: First case of *Candida auris* from the United Arab Emirates. *Int. J. Infect. Dis.* 2018;70:36–7.
4. **Alfouzan W**, Dhar R, Albarrag A, et al. The emerging pathogen *Candida auris*: A focus on the Middle-Eastern countries. *J Infect Public Health.* 2019;12:451–9.
5. **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.
6. **Al Maani A**, Paul H, Al-Rashdi A, et al. Ongoing challenges with healthcare-associated *Candida auris* outbreaks in Oman. *J Fungi (Basel).* 2019;23:5(4).
7. **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
8. **Arastehfar A**, Daneshnia F, Salehi MR, Zarrinfar H, Khodavaisy S, Haas PJ, Roudbary M, Najafzadeh MJ, Zomorodian K, Charsizadeh A, et al. Molecular characterization and antifungal susceptibility testing of *Candida nivariensis* from blood samples—An Iranian multicentre study and a review of the literature. *J. Med. Microbiol.* 2019;68:770–7.
9. **Arikan S**, Rex JH. Lipid-based antifungal agents: current status. *Curr Pharm Des.* 2001;7:393-415.

10. **Armstrong PA**, Rivera SM, Escandon P, et al. Hospital associated multicenter outbreak of emerging fungus *Candida auris*, Colombia, 2016. *Emerg Infect Dis.* 2019;25:1339–46.
11. **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.
12. **Barak O**, Asarch A, Horn T. PAS is optimal for diagnosing onychomycosis. *J Cutan Pathol.* 2010;37(10):1038-40.
13. **Bayegan S**, Szilagyi J, Kemeny-Beke A, Foldi R, Kardos G, Gesztelyi R et al. Efficacy of a single 6 mg/kg versus two 3 mg/kg caspofungin doses for treatment of disseminated candidiasis caused by *Candida albicans* in a neutropenic mouse model. *J Chemother.* 2011;23:107-9.
14. **Ben-Ami R**, Berman J, Novikov A, et al. Multidrug resistant *Candida haemulonii* and *C. auris*, Tel Aviv, Israel. *Emerg Infect Dis.* 2017;23:195–203.
15. **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.
16. **Borman AM**, Szekely A, Johnson EM. Isolates of the emerging pathogen *Candida auris* present in the UK have several geographic origins. *Med Mycol.* 2017;55:563-7.
17. **Bravo RG**, Lorenz A. What do we know about the biology of the emerging fungal pathogen of humans *Candida auris*? *Microbiol Res.* 2021;242:126621.

18. **Bravo RG**, Ross ZK, Gow NAR, Lorenz A. Pseudohyphal Growth of the Emerging Pathogen *Candida auris* Is Triggered by Genotoxic Stress through the S Phase Checkpoint. *mSphere*. 2020;5:e00151–20.
19. **Caballero U**, Eraso E, Pemán J, Quindós G, Vozmediano V, Schmidt S, Jauregizar N. In Vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling and simulation of amphotericin B against *Candida auris*. *Pharmaceutics* 2021;13:1767.
20. **Cantón E**, Pemán J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A. Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:2477-82.
21. **Carson FL**, Richmond RS. Periodic acid cannot replace chromic acid in Grocott's method for fungi. *Biotech Histochem*. 2010;85(4):270.
22. **Carolus H**, Pierson S, Lagrou K, Van Dijck P. Amphotericin B and other polyenes-discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. *J Fungi (Basel)*. 2020;27;6(4):321.
23. **CDC**. Antifungal Susceptibility Testing and Interpretation. <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/cauris-antifungal.html>
24. **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(1):68.
25. **Chen SC**, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs*. 2011;71:11-41.
26. **Chowdhary A**, Sharma C, Duggal S, et al. New clonal strain of *Candida auris*, Delhi, India. *Emerg Infect Dis*. 2013;19:1670–3.

27. **Chowdhary A**, Sharma C, Meis JF. *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. PLoS Pathog. 2017;18;13(5):e1006290.
28. **Chowdhary A**, Prakash A, Sharma C, et al. A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009–17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance. J Antimicrob Chemother. 2018;73:891–9.
29. **Chowdhary A**, Tarai B, Singh A, Sharma A. Multidrug-resistant *Candida auris* infections in critically ill Coronavirus disease patients, India, April–July 2020. Emerg. Infect. Dis. 2020;26:2694–6.
30. **Denning DW**. Echinocandin antifungal drugs. Lancet. 2003;362:1142-51.
31. **Dudiuk C**, Berrio I, Leonardelli F, Morales-Lopez S, Theill L, Macedo D, Yesid-Rodriguez J, Salcedo S, Marin A, Gamarra S, et al. Antifungal activity and killing kinetics of anidulafungin, caspofungin and amphotericin B against *Candida auris*. J. Antimicrob. Chemother. 2019;74:2295–2302.
32. **Emri T**, Majoros L, Tóth V, Pócsi I. Echinocandins: production and applications. Appl Microbiol Biotechnol. 2013;97:3267-84.
33. **Esmailzadeh A**, Zarrinfar H, Fata A, Sen T. High prevalence of candiduria due to non-albicans *Candida* species among diabetic patients: A matter of concern? J. Clin. Lab. Anal. 2018;32:e22343.
34. **Fakhim H**, Vaezi A, Dannaoui E, et al. Comparative virulence of *Candida auris* with *Candida haemulonii*, *Candida glabrata* and *Candida albicans* in a murine model. Mycoses. 2018;61:377–82.

35. **Forgács L**, Borman AM, Prépost E, Tóth Z, Kardos G, Kovács R, Szekely A, Nagy F, Kovacs I, Majoros L. Comparison of in vivo pathogenicity of four *Candida auris* clades in a neutropenic bloodstream infection murine model. *Emerg. Microbes. Infect.* 2020;9:1160–9.
36. **Gacsér A**, Trofa D, Schafer W, Nosanchuk JD. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J Clin Invest.* 2007;117(10):3049-58.
37. **Ghannoum MA**. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(1):122-43.
38. **Gomori G**. A new histochemical test for glycogen and mucin. *Am J Clin Pathol.* 1946;10(6):177-9.
39. **Grocott RG**. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. *Am J Clin Pathol.* 1955;25(8):975-9.
40. **Guarner J**, Brandt ME. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(2):247-80.
41. **Hager C**, Larkin EL, Long LA, Ghannoum MA. Evaluation of the efficacy of rezafungin, a novel echinocandin, in the treatment of disseminated *Candida auris* infection using an immunocompromised mouse model. *J. Antimicrob. Chemother.* 2018;73:2085–8.
42. **Hajar T**, Fernández-Martínez R, Moreno-Coutiño G, Vásquez Del Mercado E, Arenas R. Modified PAS stain: A new diagnostic method for onychomycosis. *Rev Iberoam Micol.* 2016;33(1):34-7.
43. **Hamill RJ**. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs.* 2013;73(9):919-34.

- 44. Herrada J**, Gamal A, Long L, Sanchez SP, McCormick TS, Ghannoum MA. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of ambisome compared to conventional amphotericin B and fluconazole against *Candida auris*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2021;65:e00306-21.
- 45. Hopster DJ**, Milroy CM, Burns J, Roberts NB. Necropsy study of the association between sudden cardiac death, cardiac isoenzymes and contraction band necrosis. *J. Clin. Pathol.* 1996;49:403–6.
- 46. Johnson CJ**, Davis JM, Huttenlocher A, et al. Emerging fungal pathogen *Candida auris* evades neutrophil attack. *mBio.* 2018;9i:e01403–18.
- 47. de Jong AW**, Hagen F. Attack, Defend and Persist: How the Fungal Pathogen *Candida auris* was Able to Emerge Globally in Healthcare Environments. *Mycopathologia.* 2019,184(3):353-65.
- 48. Khatamzas E**, Madder H, Jeffery K. Neurosurgical device-associated infections due to *Candida auris*—Three cases from a single tertiary center. *J. Infect.* 2019;78:409–21.
- 49. Kean R**, Delaney C, Sherry L, Borman A, Johnson EM, Richardson MD, Rautemaa-Richardson R, Williams C, Ramage G. Transcriptome Assembly and Profiling of *Candida auris* Reveals Novel Insights into Biofilm-Mediated Resistance. *mSphere.* 2018 ;3(4):e00334-18.
- 50. Kim HY**, Nguyen TA, Kidd S, Chambers J, Alastruey-Izquierdo A, Shin JH, Dao A, Forastiero A, Wahyuningsih R, Chakrabarti A, et al. *Candida auris*-a systematic review to inform the world health organization fungal priority pathogens list. *Med Mycol.* 2024;27;62(6):42.
- 51. Kim MN**, Shin JH, Sung H, Lee K, Kim EC, Ryoo N, Jung SI, Park KH, Kee SJ, Kim SJ, et al. *Candida haemulonii* and closely related species at 5 university

- hospitals in Korea: Identification, antifungal susceptibility and clinical features. *Clin. Infect. Dis.* 2009;48:57–61.
- 52. Kordalewska M**, Lee A, Park S, Berrio I, Chowdhary A, Zhao Y, Perlin DS. Understanding Echinocandin Resistance in the Emerging Pathogen *Candida auris*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;25;62(6):238-18.
- 53. 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;63:186-9.
- 54. Kovács R**, Tóth Z, Locke JB, Forgács L, Kardos G, Nagy F, Borman AM, Majoros L. Comparison of in vitro killing activity of rezafungin, anidulafungin, caspofungin, and micafungin against four *Candida auris* clades in RPMI-1640 in the absence and presence of human serum. *Microorganisms.* 2021;9:863.
- 55. Kumar D**, Banerjee T, Pratap CB, Tilak R. Itraconazole-resistant *Candida auris* with phospholipase, proteinase and hemolysin activity from a case of vulvovaginitis. *J Infect Dev Ctries.* 2015;9:435– 37.
- 56. Larkin E**, Hager C, Chandra J, Mukherjee PK, Retuerto M, Salem I, Long L, Isham N, Kovanda L, Borroto-Esoda K, Wring S, Angulo D, Ghannoum M. The Emerging Pathogen *Candida auris*: Growth Phenotype, Virulence Factors, Activity of Antifungals, and Effect of SCY-078, a Novel Glucan Synthesis Inhibitor, on Growth Morphology and Biofilm Formation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(5):2396-16.
- 57. Lass-Flörl C**. Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: a comparative review. *Drugs.* 2011;71:2405-19.
- 58. Ledwoch K**, Maillard JY. *Candida auris* Dry Surface Biofilm (DSB) for Disinfectant Efficacy Testing. *Materials.* 2018;12:18.

- 59. 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;49:3139–42.
- 60. Lepak AJ**, Zhao M, Berkow EL, Lockhart SR, Andes DR. Pharmacodynamic optimization for treatment of invasive *Candida auris* infection. Antimicrob. Agents Chemother. 2017;61:791-17.
- 61. Lewis RE**, Wiederhold NP. The solubility ceiling: A rationale for continuous infusion amphotericin B therapy? Clin. Infect. Dis. 2003;37:871–2.
- 62. Lockhart SR**. *Candida auris* and multidrug resistance: defining the new normal. Fungal Genet Biol. 2019;131:103243.
- 63. Lockhart SR**, Etienne KA, Vallabhaneni S, et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole genome sequencing and epidemiological analyses. Clin Infect Dis. 2016;64:134–40.
- 64. Majoros L**, Kardos G. Fungicidal activity of azole antifungal agents. Anti-Infect Agents in Med Chem. 2008;7:118-25.
- 65. McKeage K**. Posaconazole: a review of the gastro-resistant tablet and intravenous solution in invasive fungal infections. Drugs. 2015;75:397-406.
- 66. Mirhendi H**, Charsizadeh A, Aboutalebian S, Mohammadpour M, Nikmanesh B, de Groot T, Badali H. South Asian (Clade I) *Candida auris* meningitis in a paediatric patient in Iran with a review of the literature. Mycoses 2022;65:134–9.
- 67. Morales-López SE**, Parra-Giraldo CM, Ceballos Garzón A, et al. Invasive infections with multidrug resistant yeast *Candida auris*, Colombia. Emerg Infect Dis. 2017;23:162–4.

- 68. Papp Z**, Borman AM, Forgács L, Kovács R, Tóth Z, Chun-Ju C, Kardos G, Juhász B, Szilvássy J, Majoros L. Unpredictable *in vitro* killing activity of amphotericin B against four *Candida auris* clades. *Pathogens* 2021;10:990.
- 69. Pappas PG**, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L et al. Executive summary: Clinical Practice Guideline for the management of candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016;62:409-17.
- 70. Pathology Outlines**. Microbiology & infectious diseases (*Candida auris*). <https://www.pathologyoutlines.com/topic/microbiologycauris.html>
- 71. Pfaller MA**, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Evaluation of the Etest method using Mueller-Hinton agar with glucose and methylene blue for determining amphotericin B MICs for 4,936 clinical isolates of *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 2004;42:4977-79.
- 72. Pichowicz AM**, Torres SR, Torres-Velez FJ, Longyear AD, Singh N, Lasek-Nesselquist E, De Jesus M. Depletion of the microbiota has a modest but important impact on the fungal burden of the heart and lungs during early systemic *Candida auris* infection in neutropenic mice. *Microorganisms*. 2022;10:330.
- 73. Pristov KE**, Ghannoum MA. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(7):792-98.
- 74. 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.

- 75. Rapala-Kozik M**, Bochenska O, Zajac D, Karkowska-Kuleta J, Gogol M, Zawrotniak M, Kozik A. Extracellular proteinases of *Candida* species pathogenic yeasts. *Mol Oral Microbiol.* 2018;33(2):113-24.
- 76. Rossato L**, Colombo AL. *Candida auris*: what have we learned about its mechanisms of pathogenicity?. *Front Microbiol.* 2018;9:3081.
- 77. Rudramurthy SM**, Chakrabarti A, Paul RA, et al. *Candida auris* candidaemia in Indian ICUs: analysis of risk factors. 2017;72:1794–801.
- 78. Ruiz-Gaitán A**, Moret AM, Tacias-Pitarch M, et al. An outbreak due to *Candida auris* with prolonged colonisation and candidaemia in a tertiary care European hospital. *Mycoses.* 2018;61:498–505.
- 79. Sandhu P**, Xu X, Bondiskey PJ, Balani SK, Morris ML, Tang YS et al. Disposition of caspofungin, a novel antifungal agent, in mice, rats, rabbits, and monkeys. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:1272-80.
- 80. 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.
- 81. 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.
- 82. Sears D**, Schwartz BS: *Candida auris*. An emerging multidrug-resistant pathogen. *Int J Infect Dis.* 2017;63:95-8.

- 83. Sekyere J O.** *Candida auris*: a systematic review and meta-analysis of current updates on an emerging multidrug-resistant pathogen. *MicrobiologyOpen*. 2018;7:578.
- 84. Shadkchan Y,** Zaslavsky Z, Segal E. Pharmacokinetics of amphotericin B in serum and tissues in mice treated with amphotericin B-Intralipid. *Med. Mycol.* 2003;41:15–9.
- 85. Sherry L,** Ramage G, Kean R, Borman A, Johnson EM, Richardson MD, Rautemaa-Richardson R. Biofilm-forming capability of highly virulent, multidrug-resistant *Candida auris*. *Emerg Infect Dis*. 2017;23:328–31.
- 86. Singh S,** Uppuluri P, Mamouei Z, et al. The NDV-3Avaccine protects mice from multidrug resistant *Candida auris* infection. *PLoS Pathog*. 2019;15(8):e1007460.
- 87. Singhal T,** Kumar A, Borade P, Shah S, Soman R. Successful treatment of *C. auris* shunt infection with intraventricular caspofungin. *Med. Mycol. Case Rep*. 2018;22:35–7.
- 88. Sipsas NV,** Lewis RE, Tarrand J, Hachem R, Rolston KV, Raad II et al. Candidemia in patients with hematologic malignancies in the era of new antifungal agents (2001-2007): stable incidence but changing epidemiology of a still frequently lethal infection. *Cancer*. 2009;115:4745-52.
- 89. Suphavitai C,** Ko KKK, Lim KM, Tan MG, Boonsimma P, Chu JJK, Goh SS, Rajandran P, Lee LC, Tan KY, et al. Detection and characterisation of a sixth *Candida auris* clade in Singapore: a genomic and phenotypic study. *Lancet Microbe*. 2024;5(9):100878.

- 90. Szekely A**, Borman AM, Johnson EM. *Candida auris* isolates of the Southern Asian and South African lineages exhibit different phenotypic and antifungal susceptibility profiles in vitro. *J Clin Microbiol.* 2019;57(5):e02055-18.
- 91. Thompson GR**, Cadena J, Patterson TF. Overview of antifungal agents. *Clin Chest Med.* 2009;30:203-15.
- 92. Torres SR**, Pichowicz A, Torres-Velez F, et al. Impact of *Candida auris* infection in a neutropenic murine model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(3):e01625-19.
- 93. Xin H**, Mohiuddin F, Tran J, et al. Experimental mouse models of disseminated *Candida auris* infection. *mSphere.* 2019;4(5):e00339-19.
- 94. Yadav A**, Jain K, Wang Y, Pawar K, Kaur H, Sharma KK, Chowdhary A. *Candida auris* on apples: Diversity and clinical significance. *mBio* 2022;13:e00518-22.
- 95. 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.
- 96. Vallabhaneni S**, Kallen A, Tsay S, et al. Investigation of the first seven reported cases of *Candida auris*, a globally emerging invasive, multidrug-resistant fungus United States, May 2013-August 2016. *Am J Transplant.* 2017;17:296–9.
- 97. Villanueva-Lozano H**, Treviño-Rangel RJ, González GM, Ramírez-Elizondo MT, Lara-Medrano R, Aleman-Bocanegra MC, Guajardo-Lara CE, Gaona-Chávez N, Castilleja-Leal F, Torre-Amione G, et al. Outbreak of *Candida auris*

- infection in a COVID-19 hospital in Mexico. *Clin. Microbiol. Infect.* 2021;27:813–6.
- 98. Wang X**, Bing J, Zheng Q, et al. The first isolate of *Candida auris* in China: clinical and biological aspects. *Emerg Microbes Infect.* 2018;7:93.
- 99. Watkins RR**, Gowen R, Lionakis MS, Ghannoum M. Update on the Pathogenesis, Virulence, and Treatment of *Candida auris*. *Pathogens and Immunity.* 2022;7(2):46-65.
- 100. Zarrinfar H**, Kord Z, Fata A. High incidence of azole resistance among *Candida albicans* and *C. glabrata* isolates in Northeastern Iran. *Curr. Med. Mycol.* 2021;7:18–21.
- 101. Zhao Y**, Perez WB, Jiménez-Ortigosa C, Hough G, Locke JB, Ong V et al. CD101: a novel long-acting echinocandin. *Cell Microbiol.* 2016;18:1308-16.
- 102. Zhao Y**, Prideaux B, Nagasaki Y, Lee MH, Chen PY, Blanc L et al. Unraveling drug penetration of echinocandin antifungals at the site of infection in an intra-abdominal abscess model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61:e01009-17.



Nyilvántartási szám: DEENK/408/2025.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

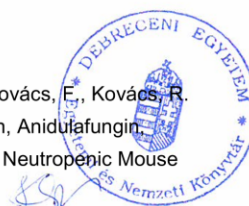
Jelölt: Forgács Lajos  
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Forgács, L.**, Borman, A. M., Kovács, R. L., Balázs, D., Tóth, Z., Balázs, B., Chun-Ju, C., Kardos, G., Kovács, I., Majoros, L.: In Vivo Efficacy of Amphotericin B against Four *Candida auris* Clades.  
*J. Fungi*. 8 (5), 1-16, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jof8050499>  
IF: 4.7
2. **Forgács, L.**, Borman, A. M., Prépost, E., Tóth, Z., Kardos, G., Kovács, R. L., Székely, A., Nagy, F., Kovács, I., Majoros, L.: Comparison of in vivo pathogenicity of four *Candida auris* clades in a neutropenic bloodstream infection murine model.  
*Emerg. Microbes Infect.* 9 (1), 1160-1169, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/22221751.2020.1771218>  
IF: 7.163

### További közlemények

3. Kovács, F., Jakab, Á., Balla, N., Tóth, Z., Balázs, D., **Forgács, L.**, Harmath, A., Bozó, A., Ragyák, Á., Majoros, L., Kovács, R. L.: A comprehensive analysis of the effect of quorum-sensing molecule 3-oxo-C12-homoserine lactone on *Candida auris* and *Candida albicans*.  
*Biofilm*. 9, 1-12, 2025.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biofilm.2025.100259>  
IF: 4.9 (2024)
4. Balázs, D., Tóth, Z., Locke, J. B., Borman, A. M., **Forgács, L.**, Balla, N., Kovács, F., Kovács, R. L., Amano, C., Baran, T. I., Majoros, L.: In Vivo Efficacy of Rezafungin, Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin against Four *Candida auris* Clades in a Neutropenic Mouse Bloodstream Infection Model.  
*J. Fungi*. 10 (9), 1-14, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jof10090617>  
IF: 4





5. Adnan, A., Borman, A. M., Tóth, Z., **Forgács, L.**, Kovács, R. L., Balázsi, D., Balázs, B., Udvarhelyi, G., Kardos, G., Majoros, L.: In Vitro Killing Activities of Anidulafungin and Micafungin with and without Nikkomycin Z against Four Candida auris Clades.  
*Pharmaceutics*. 15 (5), 1-16, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics15051365>  
IF: 4.9
6. Tóth, Z., Bozó, A., Kovács, R. L., Balogh, B., Balázs, B., **Forgács, L.**, Kelentey, B., Majoros, L.: The In Vitro Activity of Fluconazole, Amphotericin B and Echinocandins Against *Cyberlindnera fabianii* Planktonic Cells and Biofilms.  
*Mycopathologia*. 188 (1-2), 111-118, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-022-00688-9>  
IF: 3.6
7. Balla, N., Jakab, Á., Kovács, F., Ragyák, Á., Tóth, Z., Balázsi, D., **Forgács, L.**, Bozó, A., Al Refai, F., Borman, A. M., Majoros, L., Kovács, R. L.: Total transcriptome analysis of *Candida auris* planktonic cells exposed to tyrosol.  
*AMB Express*. 13 (1), 1-10, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-023-01586-z>  
IF: 3.5
8. Kovács, R. L., Tóth, Z., Locke, J. B., **Forgács, L.**, Kardos, G., Nagy, F., Borman, A. M., Majoros, L.: Comparison of In Vitro Killing Activity of Rezafungin, Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin against Four *Candida auris* Clades in RPMI-1640 in the Absence and Presence of Human Serum.  
*Microorganisms*. 9 (4), 1-12, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9040863>  
IF: 4.926
9. Nagy, F., Tóth, Z., Nyikos, F., **Forgács, L.**, Jakab, Á., Borman, A. M., Majoros, L., Kovács, R. L.: In vitro and in vivo interaction of caspofungin with isavuconazole against *Candida auris* planktonic cells and biofilms.  
*Med. Mycol.* 59 (10), 1015-1023, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myab032>  
IF: 3.747
10. Kovács, R. L., Nagy, F., Tóth, Z., **Forgács, L.**, Tóth, L., Váradi, G., Tóth, G. K., Vadász, K., Borman, A. M., Majoros, L., Galgóczy, L.: The *Neosartorya fischeri* Antifungal Protein 2 (NFAP2): a New Potential Weapon against Multidrug-Resistant *Candida auris* Biofilms.  
*Int. J. Mol. Sci.* 22 (2), 1-14, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22020771>  
IF: 6.208





11. Papp, Z., Borman, A. M., **Forgács, L.**, Kovács, R. L., Tóth, Z., Chun-Ju, C., Kardos, G., Juhász, B., Szilvássy, J., Majoros, L.: Unpredictable In Vitro Killing Activity of Amphotericin B against Four *Candida auris* Clades.  
*Pathogens*. 10 (8), 1-11, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens10080990>  
IF: 4.531
12. 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
13. 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

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 62,192**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
11,863**

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

Debrecen, 2025.06.18.



## 11. Tárgyszavak-Keywords

Virulencia, szöveti gombateher, *Candida auris*, amfotericin B, egér, hisztopatológia, *in vivo*

Virulence, fungal tissue burden, *Candida auris*, amphotericin B, mouse, histopathology, *in vivo*

## 12. Köszönetnyilvánítás

Doktori értekezésemhez nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért mindenekelőtt köszönetet kívánok mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Majoros Lászlónak, akinek a támogatása és szakmai koordinálása nélkül ez a munka nem készülhetett volna el. Köszönetet kívánok mondani Prof. Dr. Kónya Józsefnek, hogy lehetővé tette, hogy az Orvosi Mikrobiológiai Intézetben végezhettem a PhD munkámat.

Köszönettel tartozom Prof. Andrew Borman-nak és munkatársainak, amiért rendelkezésünkre bocsájtották a kísérletekben vizsgált 19 *Candida auris* izolátumot.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Kovács Renátónak az *in vivo* kísérletek és a statisztikai vizsgálatok terén nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért, valamint hogy tanácsaival és útmutatásával végig támogattak a PhD képzésem során.

Köszönetet kívánok mondani továbbá Dr. Nagy Fruzsínának és Dr. Tóth Zoltánnak, akiknek a segítségével elsajátíthattam a mikológiai laboratóriumban alkalmazott *in vitro* és *in vivo* technikákat és a kísérletes munka során végig pótolhatatlan segítséget nyújtottak.

Köszönettel tartozom Dr. Kovács Ilonának, hogy lehetővé tette számomra, hogy az *in vivo* kísérletek hisztopatológiai vizsgálatait a DEKK KGYC Pathologia Osztályán elvégezhettem.

Köszönet továbbá a DE KK Orvosi Mikrobiológiai Intézet valamennyi munkatársának, amiért befogadtak a közösségükbe és támogattak a PhD képzésem során.

Végül, de nem utolsó sorban köszönetet mondok családomnak, barátaimnak és munkatársaimnak, akik az évek alatt mindvégig mellettem álltak, és még a legnehezebb időkben is számíthattam a támogatásukra.

## 13. Fűggelék