

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Micafungin *in vitro* aktivitása ritka *Candida* fajok ellen

Dr. Saleh Qasem

Témavezető: Dr. Majoros László



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2017

Micafungin *in vitro* aktivitása ritka *Candida* fajok ellen

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Dr. Saleh Qasem, általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskolája
(Mikrobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Majoros László, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tótsaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Rozgonyi Ferenc, az MTA doktora
Dr. Emri Tamás, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem GYTK, Gyógyszerhatástani
Tanszék könyvtára
2017. október 31. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Lajszné Dr. Tóth Beáta, PhD
Dr. Urbán Edit, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tótsaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Rozgonyi Ferenc, az MTA doktora
Dr. Emri Tamás, PhD
Lajszné Dr. Tóth Beáta, PhD
Dr. Urbán Edit, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati
Intézet „A” épület tanterme
2017. október 31. 13:00 óra

Rövidítések jegyzéke

AMB	Amfotericin B
AUC	Area under the concentration curve
ATCC	American Type Culture Collection
CAS	Kazspofungin
CFU	Colony forming unit
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
C_{\max}	A gyógyszer csúskoncentrációja
C_{\min}	A gyógyszer legalacsonyabb koncentrációja
ECOFF	Epidemiological cutoff value
FLU	Flukonazol
IDSA	Infectious Diseases Society of America
MIC	Minimal inhibitory concentration
MICA	Mikafungin
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute Medium
T50/T90	Az 50 és a 99,9%-os csíraszám csökkenés eléréséhez szükséges átlagos idő
50% szérum	RPMI-1640+50% humán szérum

Előszó

Az életet veszélyeztető gombafertőzések 70-80%-ért a különböző *Candida*, 10-20%-ért az *Aspergillus*, míg a maradék 10%-ért egyéb gombafajok a felelősek. Legtöbbször súlyos alapteregségben szenvedő betegeknel diagnosztizálunk invazív *Candida* fertőzéseket, amelyeknek mortalitása, fajtól függően 20-70% is lehet. A mortalitás annak ellenére ilyen magas, hogy egyre modernebb diagnosztikus módszerek állnak rendelkezésre, illetve az utóbbi évtizedben egy újabb gyógyszer csoport (echinocandinok) és új triazolok (vorikonazol és posakonazol) is rendelkezésre állnak a klinikumban. A leggyakrabban előforduló *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* és *C. krusei* fajok mellett egyre gyakrabban izolálunk, különösen immunszupprimált betegekből olyan gombákat, amelyeket korábban apatogénnek tartottak vagy ritkaságuk miatt érzékenységük a különböző antifungális szerek iránt kevésbé ismert. Ezeknek a ritkábban izolálható fajoknak bár a virulenciájuk gyenge, immunszupprimált betegeknél 50% feletti halálozást eredményezhetnek.

Az echinocandin antifungális szerek (anidulafungin, kaszopfungin és a mikafungin) napjainkban az elsőként választandó szerek invazív *Candida* fertőzések kezelésére. Munkánkban a mikafungin *in vitro* hatékonyságát vizsgáltuk a ritkábban előforduló, de klinikailag releváns *Candida* fajok ellen. A szerzett rezisztencia mechanizmussal nem rendelkező („ún. vad típusú”) izolátumok esetében azt vizsgáltuk, hogy milyen tényezők befolyásolják a mikafungin *in vitro* hatékonyságát. Ezért a hagyományos RPMI-1640 tápközegen kívül az *in vivo* viszonyokat jobban reprezentáló, 50% szérumot tartalmazó RPMI-1640 tápközegben is meghatároztuk a nagy fehérjekötődéssel rendelkező mikafungin *in vitro* aktivitását *C. albicans* sensu stricto (a továbbiakban *C. albicans*), *C. dubliniensis*, *C. africana*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* és *C. kefyr* ATCC tesztörzsek és klinikai izolátumok ellen.

Irodalmi háttér

A Candida fertőzések patogenezise

Az invazív bakteriális és gombafertőzések gyakorisága az 1970-es évektől kezdve jelentős növekedést mutat. Kezdetben inkább a Gram-negatív kórokozók (*Escherichia coli*, különböző *Klebsiella* fajok, a *Pseudomonas aeruginosa* és az *Acinetobacter baumannii*) számítottak a legfontosabb és nehezen kezelhető kórokozók közé, de nem sokkal később a Gram-pozitív kórokozók (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* fajok) váltak gyakoribbá a nozokomiális véráramfertőzések esetén. A karbapemenek, a III.-IV. generációs cefalosporinok és a fluorokinolonok terápiás alkalmazása, az intenzív terápiás osztályokon tapasztalható hatékonyabb ellátással együtt javította a betegek túlélését. A kórházban eltöltött hosszabb idő, a radikális sebészeti beavatkozások és a daganatos betegek kemoterápiás szerekkel való kezelése miatt bekövetkező neutropénia a gombafajokkal való kolonizációhoz vezetett. A *Candida* fajok általi kolonizáció jól magyarázható a különböző virulencia faktorok előfordulásával illetve azzal, hogy kis csíraszámú a szájüregben, a vastagbélben és a hüvelyben a normál flóra részét képezik. A kolonizációban az ALS fehérje család (agglutinin-like sequence), a hifa-asszociált Hwp1 fehérje, valamint a különböző szekretált aszpartil proteinázok a fontosak, míg az invázióban a szekretált aszpartil proteinázok, a foszfolipázok és a lipázok játszanak döntő szerepet. A *Candida albicans* és a *C. dubliniensis* fajok, az egysejtű (élesztő) forma mellett hifát is képeznek, amelynek a virulenciában játszott szerepe jól ismert.

Minden olyan tényező, ami a bőr és a nyálkahártyák épségét károsítja, illetve a neutrofil granulociták számát és működését csökkenti, kolonizációhoz illetve a steril testtájak inváziójához vezethet. A centrális és perifériás katéterek által okozott, úgynevezett katéter-asszociált fertőzések patogenezisében fontos a kórokozó biofilmet létrehozó képessége. A széles spektrumú antibiotikumok használata, különösen az anaerob baktériumok ellen is hatékony antibiotikumok (amoxicillin+klavulánsav, metronidazol), valamint a túl alacsony vagy a túl magas életkor szintén prediszponál az invazív *Candida* fertőzések kialakulására.

Ritkábban előforduló Candida fajok

A leggyakoribb *Candida* fajok (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* és *C. krusei*) az invazív *Candida* fertőzések 90-95%-ért felelnek. Ennek az öt fajnak jól

ismertek a rezisztencia viszonyai a különféle antifungális szerek iránt. A ritkábban előforduló *Candida* fajok jelentősége az azonosítás nehézsége illetve a kevésbé ismert rezisztencia viszonyaik miatt fontos.

A ritkábban előforduló *Candida* fajok közül kiemelendő a *C. dubliniensis*, amely a molekuláris biológiai vizsgálatok alapján, filogenetikailag rendkívül közel áll a *C. albicans*-hoz. A faj jelentőségét az adja, hogy a *C. albicans*-hoz képest gyorsabban fejleszt ki másodlagos FLU rezisztenciát. A *C. dubliniensis in vitro* szérum és neutrofil granulociták jelenlétében gyengén vagy egyáltalán nem fejleszt hifát. Ugyancsak igazolták, hogy *in vivo* a *C. dubliniensis*, ellentétben a *C. albicans*-sal nem fejleszt hifát, csak az élesztőforma figyelhető meg szisztémás fertőzés esetén. Mindezen különbségek jól magyarázzák, hogy a *C. dubliniensis* elsősorban a nyálkahártya fertőzésekben játszik fontos szerepet, főleg HIV-fertőzötteknél. Mindezek ellenére a *C. dubliniensis* invazív fertőzéseket is okozhat, melynek a mortalitása hasonló (36,4 %), mint *C. albicans* esetén.

Az utóbbi két évtizedben több kutatócsoport írt le atípusos *C. albicans* izolátumokat, főleg vulvovaginitiszos klinikai mintákból (madagaszkári és angolai klinikai mintákból). Ezek az izolátumok, hasonlóan a *C. albicans*-hoz és a *C. dubliniensis*-hez csíratömlőt fejlesztettek szérumban, de klamidospórát rizsagar-táptalajon nem képeztek. Nem asszimilálták a trehalózt, nincs N-acetil-galaktozidáz enzimük és a másik két fajhoz képest lassabban, képeztek hifát. Molekuláris biológiai vizsgálatok bizonyították, hogy ezek az atípusos *C. albicans* izolátumok külön fajba tartoznak a *C. albicans sensu lato*-n belül, és a *C. africana* néven új fajba sorolták őket. A *C. africana* döntően tehát vulvovaginitiszos klinikai mintákból tenyészik ki, de irodalmi adatok alapján invazív fertőzést is okozhat. Valószínűleg világszerte előfordul, de kevés tanulmány áll rendelkezésre a pontos epidemiológiájáról. Antifungális szerek iránti érzékenysége hasonló a *C. albicans*-hoz és a *C. dubliniensis*-hez. A tünetekkel járó vulvovaginitiszek minden esetben gyógyultak azol-típusú (klotrimazol vagy FLU) antifungális szerekre.

A *C. guilliermondii* hasonlóan az előző két fajhoz (*C. dubliniensis* és *C. africana*) kevesebb, mint 1%-ban tenyészik ki invazív *Candida* fertőzésekben, de Dél-Amerikában akár a kandidémiák 3-5%-ért is felelős lehet. A FLU iránt csökkent érzékenységet mutathat illetve természetes, csökkent érzékenységgel rendelkezik az echinocandinok iránt. Klinikai jelentőségét az adja, hogy invazív fertőzések esetén egyidejű immunosuppresszió is gyakori, ami leukémiás betegek esetén az esetleges csökkent antifungális érzékenység miatt korlátozza a terápiásan adható antifungális szerek számát.

A *C. lusitaniae* szintén a ritkábban izolálható kórokozók közé tartozik és képes invazív fertőzések kialakítására. Főleg a véráramból izolálható, de hasüregi vagy húgyúti kórfolyamatokból egyaránt izolálható. A kórokozó azért került az érdeklődés középpontjába, mert a betegekből izolált törzsek egy része csökkent érzékenységet mutatott az AMB iránt illetve AMB terápia során könnyen alakult ki másodlagos rezisztencia. Daganatos megbetegedésben szenvedőkből illetve sebészeti beavatkozásokon átesett betegekből izolálható a leggyakrabban. A betegek általában korábban nem kaptak antifungális kezelést és szteroidot sem. A FLU iránti MIC értékük általában alacsony. Az általuk okozott mortalitás az Észak-Amerikai adatok alapján általában 30% alatti, de malignus hematológiai betegek esetén, akik főleg echinocandin kezelésben részesültek jóval 50% feletti a halálozás.

A *C. kefyr*-t először 1909-ben, kefirből izolálták. A 2004-2008 közötti Észak Amerikai (PATH Alliance Registry) felmérésben, az 5526 invazív *Candida* fertőzésből csupán 11 esetben (0,2%) izolálták. A legújabb adatok alapján hematológiai daganatos megbetegedésben szenvedő betegeknél gyakori kolonizáló gomba, illetve a véráram fertőzései esetén is gyakoribb. A kolonizáció gyakoribb a nyári időszakban, ami összefügghet azzal, hogy a joghurt és egyéb tejtermékek nem megfelelő hűtése esetén megjelenik bennük a *C. kefyr*. A *C. kefyr* a tejtermékek romlásáért felel, így a nem megfelelő hűtlánc segítheti a malignus hematológiai betegségben szenvedők kolonizációját. Egyes megfigyelések szerint, a *C. kefyr* gyakoribb kimutatása összefüggésben van azzal is, hogy a CAS helyett a MICA-t kezdték egyre gyakrabban használni. Jól dokumentált megfigyelés, hogy echinocandin terápia során 10-14 nap alatt echinocandin rezisztencia fejlődhet ki.

Célkitűzések

Invazív *Candida* fertőzések esetén a jelenlegi ajánlás szerint az echinocandinok az elsőként választandó antifungális szerek. Az echinocandinok terápiás bevezetése ellenére az invazív *Candida* fertőzések okozta mortalitás, különösen a ritkábban izolálható *Candida* fajok esetén még mindig elfogadhatatlanul magas. Mivel az echinocandinok a szérumban nagymértékben kötődnek a különböző fehérjékhez, a kötődés csökkenti a farmakológiai aktív echinocandin koncentrációt. Ezért, a minimális gátló koncentráció és az idő-ölés görbék segítségével RPMI-1640 és RPMI-1640+50% szérumban tápközegekben összehasonlítottuk a mikafungin *in vitro* aktivitását a klinikailag fontos, de ritkábban izolálható *Candida* fajok ellen, mint a *C. dubliniensis*, a *C. africana*, a *C. guilliermondii*, a *C. lusitaniae* és a *C. kefyr*. A *C. dubliniensis*-hez és a *C. africana*-hoz genetikailag közel álló *C. albicans*-t szintén vizsgáltuk. Munkánkkal választ kerestünk arra, hogy a mikafungin alkalmas-e a ritkán izolálható *Candida* fajok elleni terápiára invazív fertőzések esetén.

Anyagok és módszerek

A sarjadzó gombák eredete és azonosítása

A sarjadzó gombák tenyésztésére kloramfenikolt tartalmazó Sabouraud-agar táptalajt használtunk. A fajok előzetes azonosítására és a tenyészetek tisztaságának az ellenőrzésére a kromogén szubsztrátot tartalmazó táptalajt, a CHROMagar Candida-t (Becton Dickinson) alkalmaztuk. A *C. albicans* (3 izolátum), a *C. guilliermondii* (3 izolátum), a *C. lusitaniae* (3 izolátum) és a *C. kefyr* (4 izolátum) klinikai izolátumokat kandidémiában szenvedő betegek véréből izoláltuk. Fajsztíű azonosításukhoz az API ID 32C (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) és a MICRONAUT-Candida System (Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim, Germany) módszereket használtuk. A *C. dubliniensis* (4 izolátum) és a *C. africana* (2 izolátum) izolátumok korábbi tanulmányokból származtak és molekuláris biológiai módszerekkel azonosították őket. A *C. albicans* komplex vizsgálata esetén egy-egy ATCC tesztörzset is vizsgáltunk.

Mikafungin minimális gátló koncentráció meghatározása

A MICA törzsoldatot a CLSI ajánlása alapján készítettük (M27-A4, 2012). Két tápközeget alkalmaztunk. Az első az RPMI-1640 volt, amely a standard tápközeg antifungális érzékenység meghatározás esetén. Mivel a nagy fehérje kötődéssel rendelkező MICA esetén a fiziológiás viszonyokat akartuk modellezni ezért, humán szérummal (Sigma, Budapest) kiegészített RPMI-1640 tápközeget is alkalmaztunk (50% szérum). Mivel 50%-os szérum esetén nehéz a MIC érték szabad szemmel történő leolvasása, ezért a makro leves-hígításos módszer segítségével (1 ml végtérfogatban) határoztuk meg a MICA MIC értékeit. A legmagasabb vizsgált MICA koncentráció 32 mg/L volt.

A fiziológiás sóoldatban, denzitométerrel 0,5 McFarland sűrűségűre állított gombaszuszpenziók előállításához, 24 órás Sabouraud-agon tenyésztett gombatelepeket használtunk, majd a megfelelő csíraszám beállításához ($\sim 10^3$ CFU/mL) RPMI-1640 folyékony táptalajt alkalmaztunk. Minden esetben gombakontroll (antifungális szert nem tartalmazó) és táptalajkontroll (sarjadzó gombát nem tartalmazó) üregeket is beállítottunk.

A csöveket 35 °C-on inkubáltuk, majd 24 óra után, vizuálisan olvastuk le. A MICA MIC értéke, az a koncentráció volt, amely a kontrollhoz képest legalább 50 %-os növekedés csökkenést mutatott (prominens gátlás).

Az idő-ölés görbék felvétele

Denzitométer segítségével, $\sim 10^5$ CFU/mL kiindulási csíraszámú gombaszuszpenziót készítettünk RPMI-1640 tápközegben. A vizsgált koncentrációk 1, 4, 16 és 32 mg/L voltak, de a *C. albicans* komplex esetén a 0,25 mg/L koncentrációt is vizsgáltuk.

A táptalajt, gombaszuszpenziót, valamint a különböző koncentrációjú antifungális szereket tartalmazó csöveket folyamatosan rázatva (10 mL végtérfogatban), 35 °C-os sötét termosztátban, 48 óráig inkubáltuk. A csövekből 0, 4, 8, 12, 24 és 48 óránként kivett 100-100 μ L folyadékot, 1:10-es léptékben, fiziológiás sóoldatban hígítottuk majd a hígításokból Sabouraud-agarok felszínére $4 \times 30 \mu$ L-t cseppentettünk. Abban az esetben, amikor várható volt, hogy a kinőtt telepek száma < 1000 CFU/mL lesz, akkor a gombákat hígítás nélkül is kioltottuk. A detektálás alsó határa 50 CFU/mL. Negyvennyolc óra múlva a kinőtt telepeket megszámláltuk és a hígítási fokok figyelembe vételével kiszámítottuk az élő gombasejtek számát. A kapott csíraszámokat az idő függvényében grafikusán ábráztuk. Minden idő-ölés kísérletet legalább kétszer végeztünk el, a kapott eredményeket átlagoltuk. Az idő-ölés görbék készítésénél a computer curve-fitting software programot használtuk (GraphPad Prism 4.03 Windows verzió).

Fungicid hatásúnak tekintettük a gyógyszert, ha az életképes sejtek számát a kiindulási sejtszámhoz képest legalább $\geq 99,9$ %-kal (≥ 3 log) csökkentette. Az ennél kisebb ($< 99,9$ %; < 3 log) mértékű csíraszám csökkenést okozó antifungális szereket fungisztikus hatásúnak tekintettük.

Az ölési ráta meghatározása

Az idő-ölés kísérletek során nyert adatokat felhasználva összehasonlítottuk a MICA ölési kinetikáját RPMI-1640-ben és 50% humán szérumban. Az ölési kinetikát az $N_t = N_0 \times e^{-kt}$, összefüggés alapján számoltuk ki, ahol a N_t az élő sejtek száma adott időpontban, az N_0 a kísérlet kezdetén mért élő sejtszám, a k az ölési ráta, a t pedig az inkubációs idő. Pozitív k érték a gombasejtek ölését, míg a negatív k érték a gombasejtek növekedését jelenti. Az

illesztés jóságának vizsgálatát, az r^2 használatával ellenőriztük ($>0,8$). Az 50%-os és a 99,9%-os sejtszámcsökkenéshez szükséges időt (h) az egyes koncentrációk esetén, a $T50=0.30103/k$ illetve a $T99,9=3/k$ összefüggés alapján számoltuk ki.

A különböző izolátumok és koncentrációk közötti eltéréseket, a Tukey-féle teszttel kiegészített egyszempontos varianciaanalízissel (one-way ANOVA) vizsgáltuk mindkét tápközegben. Ugyanazon MICA koncentrációk különböző tesztközegekben kapott értékeinek összehasonlítását t-próbával végeztük. Szignifikánsnak tekintettük az eredményeket $p<0,05$ érték esetén.

In vivo kísérletek

In vitro kísérleteinkben a *C. africana* ATCC tesztörzs és a klinikai izolátum esetén 50% szérumban nagyon gyenge szaporodást észleltünk, ezért neutropéniás egérmodellben is megvizsgáltuk a *C. albicans* komplex egy-egy izolátumával azok *in vivo* szaporodóképességét. A kísérletekben BALB/c egereket alkalmaztunk (Charles River Laboratories), melyeket a „Laboratóriumi Állatok Alkalmazása és Gondozása” című útmutatóban leírtak szerint tartottunk. Az *in vivo* kísérletek engedély száma: 12/2014 DE MÁB. Fajonként 6-6 nőstény, 21-23 grammos egeret használtunk.

A *C. albicans* és a *C. dubliniensis* egy-egy véletlenszerűen kiválasztott klinikai izolátumát és a *C. africana* 97-135-ös számú klinikai izolátumokat használtuk az *in vivo* kísérletekhez. Az egereket a laterális farokvénán keresztül fertőztük (0,2 mL gombaszuszpenzió/egér). *C. albicans* esetén 6×10^4 CFU/mL, *C. dubliniensis*-nél 10^5 CFU/mL, míg *C. africana* esetén 10^6 CFU/mL fertőző dózist használtunk. A 2×10^6 CFU/mL fertőző dózis *C. africana* 97-135-ös izolátum esetén, 4 órán belül, közel 100%-os mortalitást eredményezett.

A fertőzést követő hatodik napon az egereket cervikális diszlokációval elöltük, a veséket eltávolítottuk, lemértük majd steril dörzscsészében homogenizáltuk. A különböző hígításokból 100 μ L-t oltottunk ki Sabouraud-agar táptalajra, majd 48 órás 35°C-on történő inkubálás után a kinőtt telepeket megszámláltuk. A táptalajon kitenyészett gombák statisztikai vizsgálatához Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk (GraphPad Prism 4.03, Windows). Szignifikánsnak tekintettük az eredményt $p<0,05$ érték esetén.

Eredmények

Izolátumok MIC értékei

RPMI-1640-ben a vizsgált *C. albicans* és *C. guilliermondii* klinikai izolátumok és a *C. albicans* ATCC tesztörzs érzékenynek bizonyultak a MICA iránt. A *C. dubliniensis*, a *C. lusitaniae* és a *C. kefyr* esetén a kapott MIC értékek nem voltak magasabbak mint az ECOFF értékek, ezért ezek az izolátumok „vad” típusúnak számítanak, azaz szerzett rezisztenciával nem kell számolni. Sem klinikai határérték, sem pedig ECOFF érték nem áll rendelkezésre *C. africana* esetén, bár a MIC értékek a *C. albicans* és a *C. dubliniensis* esetén mért értékekhez hasonlítottak.

Ötven százalék szérumban minden izolátum növekedett. A MIC értékek a *C. albicans* komplex esetén 16-64-szeresére nőttek az RPMI-1640-ben mért MIC értékekhez képest. A legnagyobb mértékű MIC érték növekedés a *C. kefyr* és a *C. lusitaniae* izolátumok esetén fordult elő (64-256-szoros MIC érték emelkedés). Számszerűleg 50%-os szérumban a legmagasabb MIC értéket a *C. guilliermondii* esetén mértük (32 mg/L).

Az idő-ölés görbék eredményei a *Candida albicans* komplex esetén

RPMI-1640-ben a MICA fungicid hatást csak a *C. albicans* ATCC tesztörzs és az 5265-ös számú izolátum esetén mutatott, de csak a két legmagasabb koncentráción.

A harmadik *C. albicans* izolátum és a másik két faj ellen a MICA fungisztikus hatást mutatott. *C. dubliniensis* esetén a fungisztikus hatás gyenge volt, számos esetben a maximális csíraszámcsökkenés elérése után az izolátumok újránövekedése következett be.

Az ölés dinamikáját az **ölési ráta (k)** értékek alapján elemeztük. Az ölési ráta és a vizsgált MICA koncentrációk közötti kapcsolat mindkét tesztközegben lineáris volt a vizsgált fajok esetén.

RPMI-1640-ben a MICA ölü hatása a *C. albicans* ATCC tesztörzs és a 183-as számú klinikai izolátum esetén a koncentráció növelésével fokozódott.

C. albicans-nál a legnagyobb k értéket a 183-as számú izolátumnál lehetett megfigyelni 16 és 32 mg/L MICA esetén (0,58 1/h), amely szignifikánsan magasabb volt az alacsonyabb koncentrációkon mért k értékekkel. A MICA az 5265-ös számú izolátum ellen koncentrációtól független ölü hatást mutatott a vizsgált koncentrációkon ($P > 0,05$).

C. africana esetén a k érték a 97-135-ös számú izolátumnál volt a legnagyobb 32 mg/L-en (0,13 1/h). A MICA ölü hatása rendkívül gyenge volt *C. dubliniensis*-nél, hiszen 0,25, 1 és 4 mg/L-en a CBS 8500, a 1081 és a 2953-as számú izolátumoknál a k értékek negatívak voltak, azaz növekedés következett be.

Ötven százalék szérumban a kontroll izolátumoknál az egy nagyságrendnyi (1 log) növekedéshez szükséges átlagos idő *C. albicans* és *C. dubliniensis* esetén nagyon hasonlóak voltak a két tápközegben ($P > 0,05$). Ezzel ellentétben a *C. africana* ATCC tesztörzs és a klinikai izolátum 1 nagyságrendnyi növekedéséhez szükséges idő 50% szérumban szignifikánsan nagyobb volt ($P < 0,01$), ami a faj gyenge szaporodó képességét jelzi 50% szérumban.

Ötven százalék szérumban 0,25 és 1 mg/L MICA mindhárom faj esetén hatástalan volt, hiszen minden esetben növekedés történt a kiindulási csíraszámhoz képest; az ölési ráta (k) értékek mindig negatívak voltak. A 4, 16 és 32 mg/L MICA által kiváltott ölés fajtól, izolátumtól és koncentrációtól függő volt.

C. albicans ellen a MICA fungisztikus hatású volt $4 \geq$ mg/L-en. Az ATCC tesztörzs esetén a 4, 16 és 32 mg/L-en a kétféle tápközegben mért k értékek nem különböztek egymástól szignifikánsan. A 183-as és az 5265-ös számú *C. albicans* izolátumok esetén 50% szérumban a MICA ölü aktivitása 4, 16 és 32 mg/L-en szignifikánsan csökkent az RPMI-1640-ben tapasztalt öléshez képest. A k értékek 50%-szérumban a koncentráció növelésével azonban nem nőttek szignifikánsan (koncentráció-független ölés).

A MICA a *C. africana* ATCC tesztörzs és a klinikai izolátum ellen koncentráció-függő ölü hatást mutatott, azaz a koncentráció emelésével az ölü hatás fokozódott.

A *C. dubliniensis* esetén 50% szérum, a CD36 típusörzs kivételével 4, 16 és 32 mg/L-en fokozta a MICA ölü hatását ($P < 0,05-0,001$); a maximális csíraszám csökkenés elérése után újranovekedés is ritkábban fordult elő.

In vivo kísérletek eredményei

A *C. albicans* 183-as és a *C. dubliniensis* 1081-es számú izolátumok esetén a vesékből kitenyésztett élő gombasejtek száma hasonló volt, annak ellenére, hogy *C. albicans* esetén a beadott gomba mennyisége kevesebb volt. Bár a legtöbb gombát a *C. africana* 97-135-ös izolátumnál kapták az egerek, hat nap után 4 egérnek a veséi sterilek voltak, csak két egérnél tudtunk élő gombasejtet kitenyészteni. Eredményeink alapján a *C. albicans* a

legvirulensebb, míg a *C. africana* a legkevésbé virulens (*C. albicans*>*C. dubliniensis*>*C. africana*).

Az idő-ölés görbék eredményei *Candida kefyr*, *Candida lusitaniae* és *Candida guilliermondii* esetén

RPMI-1640-ben a MICA az összes vizsgált koncentráción $\leq 4,04$ órán belül fungicid hatású volt mind a 4 *C. kefyr* izolátum ellen. A MICA ölü aktivitása koncentráció független volt a 4 *C. kefyr* izolátum ellen ($P > 0,05$).

A *C. lusitaniae* 3834 és 7849-es számú izolátumok ellen, RPMI-1640-ben, a MICA ≥ 4 mg/L-en 16,10 órán belül szintén fungicid hatást mutatott, míg az 582-es izolátum esetén ≥ 1 mg/L-en a hatás fungisztikus volt. Mindhárom izolátum esetén a MICA ölü hatása koncentrációtól független volt ($P > 0,05$).

RPMI-1640-ben a MICA csak 32 mg/L-en és csak két *C. guilliermondii* izolátum ellen mutatott fungicid hatást. Mindhárom izolátumnál a maximális csíraszám csökkenés elérése után több koncentráción újranövekedés volt megfigyelhető. A MICA ölü hatása ebben az esetben is koncentráció-független volt.

Ötven százalék szérumban *C. kefyr* ellen 0,25, 1 és 4 mg/L MICA nem okozott növekedés gátlást, a *k* értékek minden esetben negatívak voltak. A két magasabb koncentráción a ölés gyors volt ($\leq 3,03$ óra), és az ölési ráta értékek nem különböztek szignifikánsan az RPMI-1640-ben mért értékektől.

C. lusitaniae ellen a MICA ölü aktivitása a 3834-es számú izolátum kivételével (32 mg/L-en) szignifikánsan csökkent. Még 16 és 32 mg/L MICA esetén is a csíraszám csökkenés csupán átmeneti volt a 2 másik izolátum esetén. Az ölési ráta értékek mindig negatívak voltak, kivéve a 3834-es számú izolátumot 32 mg/L-en.

A MICA *k* értékek 50% szérumban a *C. guilliermondii* izolátumok ellen mindig negatívak voltak. Átmeneti, minimális ($-0,05$ log CFU/mL) csíraszámcsökkenés csak az 5540-es számú izolátum esetén fordult elő.

Megbeszélés

Az echinocandinok használata 2001-ben, a CAS bevezetésével kezdődött és azóta az elsőként választandó antifungális szerekké váltak az invazív *Candida* fertőzések

kezelésében. Az IDSA 2016-os ajánlása alapján a központi idegrendszeri, a húgyúti és a szemfertőzések kivételével gyakorlatilag az elsőként választandó szerek, beleértve a kandidémiák (neutropéniás és nem-neutropéniás betegek esetén), a krónikus disszeminált kandidiázis, az endokarditisz kezelését, a hasüreg és az ízületek *Candida* fajok okozta fertőzéseit. Az IDSA 2016-os ajánlása nem tesz különbséget az echinocandinok használata között, így elméletileg bármelyik a 3 echinocandin közül, alkalmazható megfelelő indikáció esetén.

Az echinocandinok széleskörű alkalmazása Észak-Amerikában, Nyugat-Európában és Japánban szinte rutinszerűvé vált invazív *Candida* fertőzések kezelésére, miközben az AMB (beleértve a lipid-asszociált változatokat is) jelentősen visszaszorult a terápiás alkalmazásból. A FLU használata jelentősen nem változott. Az echinocandinok használatának széleskörű elterjedését világszerte jelentősen korlátozta a magas napi ár; 5-6 évvel ezelőtt Magyarországon a napi kezelési költség bármelyik echinocandin esetén jóval 100 ezer forint felett volt. Pedig ennek az új gyógyszercsoportnak fontos szerepe lehetett volna hazánkban is, hiszen a Debreceni Egyetem klinikáin a kandidémiák okozta átlagos halálozás 60%-os volt az 1999-2009 közötti időszakban (nem publikált adatok, Dr. Majoros László közlése alapján). Szerencsére az utóbbi 3-4 évben az echinocandinokkal történő napi kezelés ára a korábbi ár negyedére csökkent, így az echinocandinok ma már Magyarországon is a könnyebben elérhető antifungális szerek közé tartoznak.

Invazív *Candida* fertőzések esetén a legtöbb információ a véráram *Candida* fertőzéseiről található az irodalomban. Figyelembe kell azonban venni, hogy a kórokozók a vérből egyéb szervekbe is bekerülhetnek (máj, lép, vesék, stb.) létrehozva ezzel a sokkal súlyosabb disszeminált kandidiázist (Kontoyiannis és mtsai. 2000). Ráadásul olyan szervek is fertőződhetnek, ahová a különböző antifungális szerek penetrációja gyenge (szem, ízületek, pleurális és a peritoneális terek) megnehezítve ezzel az antifungális kezelést. Mivel a véráramban és egyéb testtájakon a fehérjék koncentrációja jelentős lehet, ezért a nagy fehérje kötődéssel rendelkező antifungális szereknél (AMB, echinocandinok, posakonazol) testtájéktól függően nemcsak a gyógyszer szintje lehet alacsony, de az adott testtájék fehérje mennyiségétől függően a szabad, azaz farmakológiailag aktív gyógyszer szint is alacsony lehet, ami terápiás sikertelenséghez vezethet. Mindazonáltal a szérumban lévő fehérjék nemcsak negatívan befolyásolhatják az echinocandinok klinikai hatékonyságát. Ezen elmélet szerint az albumin echinocandin rezervoárként működik, ahonnan azok ledisszociálva fenntartják a megfelelő gyógyszer koncentrációt, ha a szabad

echinocandin koncentráció csökkenne. Hipoalbuminémia esetén a csökkent kolloidozmotikus nyomás miatt csökkent mértékű lehet az echinocandinok diffúzója a szövetekbe, ami a többszervi elégtelenséggel együtt magasabb szérumban echinocandin szintet eredményezhet, miközben a belső szervekben az echinocandin koncentráció alacsonyabb lesz. Nagymértékű elhízás a nagyobb perctérfogat és vérmennyiség miatt, szintén jelentősen befolyásolja az echinocandinok farmakokinetikáját. A szérumban lévő echinocandin koncentráció kisebb lesz, mivel a hidrofil echinocandinok a zsírszövetbe penetrálnak, a zsírszövetnek pedig közel 30%-a víz.

Kritikus állapotban lévő betegek esetén a kialakuló patofiziológiai változások (szepszis, hipoalbuminémia, megváltozott kapilláris permeabilitás, máj- és veseelégtelenség és a folyadék egyensúly zavara) alapvető hatással vannak az antibakteriális és az antifungális szerek farmakokinetikájára. Mind a CAS mind pedig a MICA esetén kimutatták, hogy az intenzív terápia osztályokon ápolott betegek esetén az AUC_{0-24} , a C_{max} és a C_{min} értékek szignifikánsan alacsonyabbak az egészséges kontrollokhoz vagy a nem intenzív terápia osztályokon ápoltakhoz képest. Ezek a farmakokinetikai változások nem meglepőek ha figyelembe vesszük, hogy a betegek egy része hemodinamikailag instabil, így alacsony perctérfogat miatt vazopresszor terápiát igényel. Ezzel pedig szoros összefüggésben van a szervek hipoperfúziója, a hipoperfúzió miatti szervkárosodás, így a súlyos állapotban lévő betegeknél a gyógyszerek eloszlási térfogata illetve eliminációja is megváltozik. Ezzel magyarázható, hogy sebészeti intenzív terápia osztályokon lévő betegeknél az echinocandinok koncentrációja a szérumban magasabb lehet az egészséges kontrollokhoz képest, az echinocandinok csökkent eloszlási térfogata és/vagy a csökkent kiválasztása miatt.

A MICA-val végzett kísérleteink az echinocandinok hatékonyságának a még pontosabb megismerését szolgálták a ritkábban előforduló *Candida* fajok ellen. Vizsgálataink talán segítenek megérteni az echinocandin kezelés korlátait az echinocandin rezisztenciával nem rendelkező fajok ellen. Munkacsoportunk korábbi kísérleteiben főleg a CAS szerepelt, mivel ezt az echinocandint vezették be leghamarabb a gyógyászatba és vált Magyarországon is elérhetővé. Az utóbbi 5-6 évben azonban, a MICA is egyre gyakrabban került alkalmazásra a Debreceni Egyetem klinikáin, ezért munkacsoportunk figyelme már korábban a MICA irányába terelődött.

Korábbi kísérleteink a 99,8%-os fehérje kötődéssel rendelkező MICA-ról bizonyították, hogy 50% szérumban a klinikailag fontos *Candida* fajok ellen a MIC értékek 4-128-szor

magasabbak, mint az RPMI-1640-ben mért MIC értékek. Ötven százalékos szérumban mindegyik *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* és *C. inconspicua* izolátum ellen a ≤ 4 mg/L MICA fungisztikus vagy fungicid hatású volt (Földi és mtsai. 2012). Ez a szérum koncentráció (C_{\min}) napi 100 mg MICA adagolásával könnyen elérhető. *C. krusei* és a „psilosis” csoport tagjai ellen csak a 8-32 mg/L MICA bizonyult fungisztikus vagy fungicid hatásúnak; ezek a koncentrációk csak az emelt napi dózisok (150-300 mg) csúcskoncentrációival (C_{\max}) érhetők el. Figyelembe véve, hogy a csúcskoncentrációk csak 1-2 órán keresztül vannak jelen a szérumban, a *C. krusei* és a „psilosis” csoport tagjai ellen a MICA és valószínűleg a másik két echinocandin sem hatékony teljes mértékben.

Az *in vitro* antifungális érzékenység meghatározás ma már alapvető követelmény invazív gombafertőzések esetén. A baktériumok esetén alkalmazott módszereket az 1990-es években adaptálták és sikerült olyan tápközeget találni (RPMI-1640), amelynek segítségével a világ különböző részeiről származó MIC meghatározási eredmények kompatibilisekké váltak egymással. Az antifungális szerek klinikai határértékei és az ECOFF értékek is RPMI-1640 tápközegben mért MIC értékek alapján kerültek meghatározásra, jó támpontot nyújtva ezzel a leghatásosabb antifungális szer alkalmazására. A későbbiek során a nagy fehérje kötődéssel rendelkező echinocandinok esetén már felmerült, hogy az RPMI-1640-ben mért *in vitro* eredmények és az *in vivo* hatékonyság között a korreláció nem mindig fedezhető fel. Maki és mtsai. (2008) neutropéniás egérmódelben kimutatták, hogy a MICA *in vivo* hatékonysága *C. albicans* esetén szorosabb összefüggésben áll az 50% szérumban mért MIC értékekkel, mint az RPMI-1640-ben mért MIC értékekkel. Munkacsoportunk ezt a megfigyelést a CAS *in vitro* és *in vivo* hatékonyságának az összehasonlító vizsgálata során *C. albicans*, *C. krusei* és *C. inconspicua* fajok esetén korábban már megerősítette.

Jelen munkánk során *in vitro* kapott eredményeinket *in vivo* vizsgálatokkal ugyan nem erősítettük meg, de kapott eredményeink elég alapot szolgáltatnak ahhoz, hogy megmagyarázzuk a ritka *Candida* fajok esetén megfigyelhető terápiás sikertelenség egyik lehetséges magyarázatát. RPMI-1640-ben az általunk vizsgált 6 *Candida* faj MIC értékei hasonlóak voltak a nemzetközi irodalomban fellelhető adatokhoz, azaz vagy érzékenyek voltak MICA iránt (*C. albicans* és *C. guilliermondii*), vagy pedig a MIC értékek nem voltak magasabbak az ECOFF értékeknél (*C. dubliniensis*, *C. kefyr* és *C. lusitaniae*). Az idő-ölés görbék felvétele során a szérumban könnyen elérhető koncentrációkon a *C. albicans* komplex mindhárom tagja és a *C. kefyr* ellen a MICA már 0,25 mg/L esetén is

fungicid vagy fungisztatikus hatással rendelkezett. A leggyengébb hatás a *C. dubliniensis* ellen volt megfigyelhető (újranövekedés illetve negatív ölési ráta értékek több koncentráción is). Hasonló eredményeket kaptak RPMI-1640-ben Gil-Alonso és mtsai. (2015) a *C. albicans* komplex tagjai illetve Cantón és mtsai. (2013) *C. lusitaniae* esetén. Az echinocandinok iránt természetes, csökkent érzékenységgel rendelkező *C. guilliermondii* izolátumok közül az 5465-ös és 21060-as esetén csak 16 és 32 mg/L-en tapasztaltunk pozitív k értéket (ölést), 1 és 4 mg/L-en mindkét izolátum a kontrollhoz hasonló növekedést mutatott.

Ötven százalék szérumban 32 mg/L MICA sem volt képes meggátolni a *C. guilliermondii* izolátumok növekedését (minden esetben negatív k értékeket kaptunk). A *C. guilliermondii* viselkedése hasonló volt korábbi munkánkban szereplő *C. parapsilosis* sensu stricto-hoz, amelyben a 32 mg/L MICA igen gyenge fungisztatikus hatást mutatott az echinocandinokkal szemben csökkent érzékenységet mutató *C. parapsilosis* sensu stricto izolátumok ellen. A MICA által kifejtett ölés csökkenésének a mértéke sokkal meglepőbb volt a *C. kefyr* (csak 16 és 32 mg/L MICA esetén volt a k érték pozitív) és a *C. lusitaniae* (csak a 3834-es számú izolátumnál, és csak 32 mg/L-en volt pozitív a k érték) esetén. A gyakorlatban ez azt jelenti, hogy a napi 150 mg MICA esetén elérhető C_{\min} értéknél (4,85 mg/L) ezek a koncentrációk jóval nagyobbak, azaz a *C. kefyr*, a *C. lusitaniae* és a *C. guilliermondii* ellen a MICA hatástalan. Bár napi 150 mg MICA terápia esetén a C_{\max} értékek 20-30 mg/L körül is lehetnek, a rövid ideig tartó gyógyszer expozíciónak a szérumban nincs csíraszámot csökkentő hatása, ahogy ezt már korábbi munkánkban a CAS esetén is bizonyítottuk. Eredményeink jól korrelálnak az irodalmi adatokkal, amelyekben a három faj ellen az echinocandinok a neutropéniás egerek veséit még 7-10 napos emelt dózisú echinocandin terápia után sem képesek sterilizálni. Bár a három faj virulenciája neutropéniás egérmodellek alapján szignifikánsan alacsonyabb mint a *C. albicans* virulenciája, a MICA 50% szérumban mutatott hatástalansága magyarázhatja a tartósan neutropéniás betegek esetén tapasztalt nagymértékű halálozást. Mindamellert azt is figyelembe kell venni, hogy az alacsony virulencia miatt a betegekben tartósan perzisztáló gomba az alacsony echinocandin koncentráció következtében könnyen rezisztenssé válhat, tovább nehezítve ezzel a terápiás lehetőségeket.

Ötven százalék szérumban kevésbé drasztikusan változtatta meg a MICA ölési képességét a *C. albicans* izolátumok és az ATCC tesztörzs ellen (≥ 4 mg/L MICA fungisztatikus hatása megmaradt). Ezzel ellentétben *C. dubliniensis* ellen az RPMI-1640-ben igen gyenge MICA

aktivitás 50% szérumban szignifikánsan növekedett; 4, 16 és 32 mg/L-en pozitív *k* értékeket (ölést) figyeltünk meg. A MICA ölü hatása RPMI-1640-ben *C. dubliniensis* ellen annyira gyenge volt, hogy csak a T50 értékeket lehetett a legtöbb koncentráción számolni.

Mivel az echinocandinok hatékonysága klinikailag bizonyított *C. dubliniensis* ellen, az RPMI-1640-ben mért igen gyenge MICA hatás megtévesztő lehet a hagyományos (RPMI-1640 alapú) érzékenység meghatározás során. Ennek ellenére az intenzív terápiás osztályokon tapasztalható magas mortalitás miatt a MICA (és a másik két echinocandin) hatékonysága *C. albicans* és *C. dubliniensis* ellen nem egyértelmű. A klinikai rezisztencia mögött állhat a már korábban említett alacsony AUC_{0-24h}/MIC , C_{max} és C_{min} illetve az echinocandinoknak a fertőzött helyre való gyenge penetrációja. Ez utóbbira Grau és mtsai. (2015) vizsgálatai szolgáltatottak fontos adatokat, akik 10 hasi műtéten átesett, sebészeti intenzív osztályokon peritonitisz miatt kezelt, kritikus állapotban lévő betegek peritoneális folyadékából határozták meg a MICA koncentrációját. A 10 beteg közül négy esetében a peritoneális folyadékból *C. albicans* tenyésztett ki (a MICA MIC értékek minden esetben $\leq 0,016$ mg/L voltak). Napi 100 mg MICA terápia során az első és a harmadik napon a plazmában a MICA C_{max} értékek mediánjai 5,7 illetve 4 mg/L voltak. Ugyanebben az időpontokban a peritoneális folyadékok MICA C_{max} értékek mediánjai 0,9 illetve 1,2 mg/L voltak. A plazma/peritoneális folyadék AUC_{0-24h} hányadosa 0,3 volt az első és a harmadik napon. A napi 100 mg MICA tehát megfelelő szérumszintet biztosított, de a peritoneális folyadékban a gyengébb penetráció miatt sokkal alacsonyabb MICA koncentráció volt jelen. Yamada és mtsai. (2011) napi 150 mg MICA adagolás esetén hasonló MICA koncentrációt mértek a pleurális folyadékban (0,56-0,58 mg/L) és a peritoneális folyadékban (1,02 mg/L). Figyelembe véve, hogy peritonitisz (vagy pleuritisz) esetén a fehérje tartalom igen magas lehet (>25 g/L), a gomba ölése lassú lehet vagy egyáltalán nem is megy végbe. Ennek következtében nagymértékben megnövekszik a veszélye annak, hogy hasüregi *Candida* fertőzések esetén (tályog, peritonitisz, epehólyag gyulladás) az alacsony echinocandin szint miatt másodlagos rezisztencia alakulhat ki, főleg *C. glabrata* de *C. albicans* esetén is.

A *C. africana* esetén kapott eredmények annak ellenére érdekesek, hogy csupán egy-egy ATCC tesztörzs és klinikai izolátum állt rendelkezésre a kísérletekhez. Az RPMI-1640-ben kapott eredmények (MIC és idő-ölés görbék vizsgálata) nem különböztek jelentősen a *C. albicans* és *C. dubliniensis* izolátumokkal kapott eredményekkel. Az 50% szérumban tapasztalt lassú növekedés azonban felhívta a figyelmet arra, hogy ennek kórokozónak a

steril testtájokról való igen ritka izolálása összefüggésben állhat a szérumnak a kórokozót gátló hatásával. Neutropéniás egérmodellünk megerősítette, hogy a *C. africana in vivo*, ellentétben a *C. albicans*-sal és a *C. dubliniensis*-sel nagyon rosszul szaporodik. Annak ellenére, hogy *C. africana* esetén az egerek legalább egy nagyságrenddel nagyobb fertőző dózist kaptak, az egerek veséinek a többsége teljesen steril volt. A fajnak valószínűleg hiányoznak azok a virulencia faktorai, amelyek a nyálkahártyafelszínekről a steril testtájukba való transzlokálódásért felelősek. Eredményeink megegyeznek Borman és mtsai. (2013) eredményeivel, akik a 3 faj virulenciáját a nagy viaszmolylepke (*Galleria mellonella*) lárváival vizsgálta. Mindazonáltal eredményeink alapján a *C. albicans*, a *C. dubliniensis* és a *C. africana* MICA iránti érzékenysége nagyon hasonló, így azokban a diagnosztikai laboratóriumokban ahol nem adottak a feltételek a 3 faj egymástól való pontos elkülönítésére terápiás szempontból valószínűleg nem követnek el jelentős hibát. A 3 faj pontos elkülönítése epidemiológiai szempontból továbbra is fontos lehet.

Munkánk során a MICA *in vitro* hatékonyságát hasonlítottuk össze a hagyományos RPMI-1640 és az *in vivo* viszonyokat jobban reprezentáló 50% szérumot tartalmazó tápközegekben ritkábban előforduló *Candida* fajok ellen. Ezen összehasonlító vizsgálatnak azért van jelentősége, mivel invazív *Candida* fertőzések esetén, a sarjadzó gomba növekedésének a hemokultúra palackból való észlelése idején, még semmilyen információ nem áll rendelkezésre a gomba fajára és antifungális érzékenységére vonatkozólag. Az IDSA (2016) jelenlegi ajánlása a „vak” terápia során egyértelműen az echinocandinok adását javasolja. Az echinocandinokkal való terápiás tapasztalatok főleg az 5 leggyakoribb *Candida* fajra vonatkozóan vannak de teljesen logikus, hogy a kedvező farmakokinetikájú és kevés mellékhatással rendelkező echinocandinok a preferáltak a ritka *Candida* fajok ellen is. Eredményeink alapján a ritkábban izolálható fajok (*C. kefyr*, *C. lusitaniae*) esetén, bár az RPMI-ben kapott MICA MIC értékek nagyon közel állhatnak az echinocandinok iránt nagymértékben érzékeny *C. albicans*, *C. glabrata* vagy *C. tropicalis* fajok MIC értékeihez, a szérum alapú tápközegben végzett MIC meghatározás és ölési görbe felvétele sokkal nagyobb mértékű hatáscsökkenést mutathat, mint *C. albicans*, *C. glabrata* vagy *C. tropicalis* esetén. A MICA hatáscsökkenése kevésbé volt meglepő *C. guilliermondii* esetén, hiszen a faj természetes, csökkent érzékenységgel rendelkezik az echinocandinok iránt. Mindezek tükrében a legjobb megoldásnak az tűnik, ha a pontos fajmeghatározás után a beteg klinikai állapotát figyelembe véve döntünk a további terápiáról. Ha a ritka faj által okozott invazív *Candida* fertőzés klinikai és mikrobiológiai (a kórokozót a kezelés

eradikálta) szempontból is javul a standard dózisú echinocandin terápiára, akkor az echinocandin kezelést folytatni lehet. Ha a beteg állapota rosszabbodik, akkor az AMB jöhet szóba (lipid-asszociált változatok is). Ha a kórokozó a többi antifungális szer iránt csökkent érzékenységet mutat, akkor az echinocandin napi dózisának az emelése vagy kombinációs terápia segíthet a beteg állapotának a nem megfelelő javulása esetén.

Eredmények összefoglalása

Invazív *Candida* fertőzések esetén a jelenlegi ajánlás szerint az echinocandinok (anidulafungin, kaszopfungin és a mikafungin) az elsőként választandó antifungális szerek. Az echinocandinok terápiás bevezetése ellenére az invazív *Candida* fertőzések okozta mortalitás, különösen a ritkábban izolálható *Candida* fajok esetén még mindig elfogadhatatlanul magas. Munkánkban a minimális gátló koncentráció (MIC) és az idő-ölés görbék segítségével összehasonlítottuk a mikafungin *in vitro* aktivitását RPMI-1640 és 50% szérum tápközegekben *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. africana*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* és *C. kefyr* izolátumok ellen.

RPMI-1640-ben a *C. albicans* (MIC \leq 0,03 mg/L) és *C. guilliermondii* (MIC \leq 1 mg/L) izolátumok érzékenyek bizonyultak mikafungin iránt. *C. dubliniensis* (MIC \leq 0,03 mg/L), *C. lusitaniae* (MIC \leq 0,25 mg/L) és a *C. kefyr* (MIC \leq 0,12 mg/L) esetén a MIC értékek nem voltak magasabbak, mint az epidemiológiai határértékek. A *C. africana* esetén a MIC értékek 0,015 mg/L voltak. A mikafungin a vizsgált fajok ellen a MIC közeli értékeken fungicid vagy fungisztikus hatásúnak bizonyult.

Ötven százalék szérumban a MIC értékek *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. africana* esetén 16-64-szeresére nőttek az RPMI-1640-ben mért MIC értékekhez képest, és \geq 4 mg/L-n, klinikailag könnyen elérhető koncentráción a mikafungin fungisztikus szernek bizonyult. A *C. africana*, *in vivo* nagyon gyenge szaporodó képességgel rendelkezett. A MIC értékek *C. kefyr*, *C. lusitaniae* és *C. guilliermondii* ellen 64-256, 64-128 illetve 32-64-szeresére nőttek az RPMI-1640-ben mért MIC értékekhez képest. Az ölési ráta értékek *C. kefyr* esetén csak 16 és 32 mg/L-en, míg az egyik *C. lusitaniae* izolátum ellen csak 32 mg/L értékeken voltak pozitívak. *C. guilliermondii* esetén még 32 mg/L-en is minden esetben az ölési ráta értékek negatívak voltak.

Eredményeink alapján a ritkábban izolálható fajok (*C. kefyr*, *C. lusitaniae*) esetén, bár az RPMI-1640-ben kapott mikafungin MIC értékek nagyon közel állhatnak az echinocandinok iránt érzékeny fajok MIC értékeihez, a szérum alapú tápközegben végzett MIC meghatározás és az ölési görbe felvétele sokkal nagyobb mértékű hatáscsökkenést mutathat, mint az echinocandinok érzékeny *Candida* fajok esetén. Ezért, ritka *Candida* fajok ellen az echinocandinokat csak kellő óvatossággal szabad alkalmazni. Vizsgálataink alapján a 3 genetikailag közel álló faj esetén (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. africana*) a legvirulensebb a *C. albicans*, míg legkevésbé virulens a *C. africana*.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni elsősorban témavezetőmnek, Dr. Majoros László Egyetemi Docens Úrnak, hogy érdeklődésemet felkeltette ezen kutatási témában, hasznos tanácsaival útmutatót adott, mindig segítségemre volt és munkámat végig támogatta.

Köszönöm Dr. Kónya József Intézet Igazgató Úrnak, hogy intézetében lehetővé tette számomra a PhD tanulmány, valamint a kísérleti munka elvégzését.

Külön köszönetemet szeretném kinyilvánítani Dr. Kovács Renátó László Tanársegéd Úrnak a kísérlet során adott tanácsaiért és segítőkészségéért.

Köszönet illeti az Orvosi Mikrobiológiai Intézet minden munkatársát, amiért segítő munkájukkal lehetővé tették kutatásomat és PhD értekezésem megírását.

Hálával tartozom elsősorban családomnak: feleségemnek, Gabinak és két gyermekemnek, Ádámnak és Medinek kitartásukért, támogatásukért, ösztönző magatartásukért, mivel nélkülözniük kellett jelenlétemet tanulmányaim idejére.

Végül, de nem utolsó sorban Ph.D értekezésemet elhunyt szüleim emlékének ajánlom, akik büszkék lennének az eddig elért sikereimre, megalapozták a jövőmet, útnak indítottak az életben.



Nyilvántartási szám: DEENK//2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Saleh, Qasem
Neptun kód: R6UOS7
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Saleh, Q.**, Kovács, R. L., Kardos, G., Gesztelyi, R., Kardos, T., Bozó, A., Majoros, L.: Decreased Killing Activity of Micafungin Against *Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae*, and *Candida kefyr* in the Presence of Human Serum.
Microb. Drug Resist. [Epub ahead of print], 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2016.0241>
IF: 2.306 (2016)
2. Kovács, R. L., **Saleh, Q.**, Bozó, A., Tóth, Z., Gesztelyi, R., Kardos, T., Kardos, G., Takács, I., Majoros, L.: Killing Activity of Micafungin Against *Candida albicans*, *C. dubliniensis* and *Candida africana* in the Presence of Human Serum.
Mycopathologia. [Epub ahead of print], 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-017-0178-9>
IF: 1.71 (2016)





További közlemények

3. Domán, M., Kovács, R. L., Kardos, G., Gesztelyi, R., Juhász, B., Bozó, A., Kardos, T., **Saleh, Q.**, Majoros, L.: Killing rates of caspofungin in 50 percent serum correlate with caspofungin efficacy against *Candida albicans* in a neutropenic murine model.
Current Drug Del. 13 (2), 255-264, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1567201812666150623091336>
IF: 2.516

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 6,532

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 4,016

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

Debrecen, 2017.08.15.



Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek listája

Majoros L, Kovács R, Kardos G, Bozó A, **Saleh Q**, Tóth Z: Humán szérum csökkenti a micafungin ölé hatását *Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae* and *Candida kefyr* fajok ellen. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2015. évi Nagygyűlése, 2016. október 15-17. Keszthely. MIE -7

Bozó A, Domán M, Kovács R, Perlin DS, Kardos G, Kardos T, Tóth Z, **Saleh Q**, Majoros L: Dose escalation studies with caspofungin against *Candida glabrata*. 17TH INTERNATIONAL CONGRESS OF THE HUNGARIAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 2015, **62**:MPP-2