

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Forgács Lajos

Témavezető: Prof. Dr. Majoros László



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2025

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

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

Írta: Forgács Lajos okleveles klinikai laboratóriumi kutató

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

Témavezető: Prof. Dr. Majoros László, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Domán Marianna, PhD
Lajszné Dr. Tóth Beáta, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Vecsernyés Miklós, PhD
tagok: Dr. Domán Marianna, PhD
Lajszné Dr. Tóth Beáta, PhD
Engediné Dr. Fehér Enikő, PhD
Dr. Varga István, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épületének előadó terme.
2025. december 17. 13 óra.

Bevezetés

A *Candida auris* egy multidrog-rezisztens, opportunista kórokozó, amit első ízben 2009-ben azonosítottak Japánban (Sato 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 (fungus burden) meghatározások és hisztopatológiai vizsgálatok által.

Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki, hogy meghatározzuk az általunk rendelkezésre álló *C. auris* klinikai izolátumok *in vivo* virulenciáját neutropéniás egérmodellben, 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 egérmodellben 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.

Anyagok és módszerek

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.

A kísérletben felhasznált egerek immunszuppressálása

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.

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 sejszámolást 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 5×10^4 CFU/mL gombasejt mennyiséget kaptak. A kísérletek során alkalmazott dózisokat az előkísérleteink során állapítottuk meg.

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 fiziológias sóoldatot kaptak intraperitoneálisan (Bayegan és mtsai. 2011).

Letalitási kísérlet

A letalitási kísérletek során az egyes csoportok megfigyelése 21 napig tartott. A vizsgálat időtartama alatt az egyedek neutropéniás 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.

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 fiziológias 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 megszámláltuk. A kitenyésztett gombák számát CFU/g értékben adtuk meg, a kimutatás alsó határa 50 sejt/szövet (gramm) volt (Bayegan és mtsai. 2011).

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 nekrozis kimutatása céljából Mallory-féle foszforwolframsavas hematoxin (PTAH) festést alkalmaztunk a szív szöveti mintákon.

Vizelettenyésztés

Az amfotericin B *in vivo* hatékonyságát vizsgáló letalitási kísérleteink során felmerült részünkről az igény, hogy információt nyerjünk a kísérletben résztvevő kezelt és kezeletlen csoportok 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 vizelet tenyésztés 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.

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 amfotericin B-vel kezelt és kezeletlen csoportok vizeletéből meghatározott CFU/ml értékeket Student's t-próbával hasonlítottuk össze.

Eredmények

***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 kládroz tartozó törzsekkel fertőzött csoportok képeztek kivételt. Olyan tüneteket, amelyek a központi idgerendszeri érintettségre utaltak volna, szintén nem voltak tapasztalhatók. Az egyes kládakon belül szignifikáns különbségek voltak a letalitásban (dél-amerikai: $P=0,0005$, dél-ázsiai: $P=0,0010$, dél-afrikai: $P<0,0001$, kelet ázsiai: $P=0,0255$).

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. 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.

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.

***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%) és a mérsékelt letalitású (30-60%) 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 mérsékeltettek 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 összevetésben a kelet-ázsiai 15-ös, valamint a dél-ázsiai 164-es 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 (3.6×10^6 CFU/g), a legkevesebbet pedig az ugyanehhez a kládroz tartozó 164-es izolátum esetében (6.5×10^3 CFU/g).

A *C. albicans* izolátummal (3666) fertőzött csoport egyedeinek a második és hatodik napi szervtenyésztéseinek 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, ami alacsonyabb mint a magas letalitású *C. auris* izolátumok esetén tapasztalt értékek. A hatodik napi boncolásból származó szív és vese szervtenyésztetek gombasejt számai hasonlóak voltak a magas letalitású *C. auris* izolátumok eredményeihez.

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

A szöveti perzisztencia kísérletekhez oltott csoportokból kládonként 2 egyedot használtunk fel a szövettani vizsgálatokhoz, valamint a szív korai érintettségének vizsgálata céljából minden kládból egy-egy egyedot felboncoltunk 24 órával a fertőzést követően. A letalitási kísérletek 7 frissen elhullott példányát is felboncoltuk és megvizsgáltuk. A vizsgálatokhoz a dél-ázsia 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 bimbózdó 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 bimbózdó gombasejteket és blasztonidiumokat. 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.

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.

A máj szövetében nagyméretű gombasejt aggregátumokat találtunk a dilatált szinuszoidokban, a parenchimában a gombasejtek radiálisan terjedtek tovább, a lobulusok centrális nekrozisával.

A lép kisfokú szöveti érintettsége volt tapasztalható a vizsgálatok során, alacsony sejtszámú gombasejt csoportokat, blasztonidiumokat és bimbózdó gombasejteket figyeltünk meg.

***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 blasztonidiumok, bimbózdó gombasejtek voltak megfigyelhetők. A szívben, a

vesékben és a lépben pszeudihifák 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.

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.

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. 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.

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.

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.

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.

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.

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.

A dél-amerikai klád izolátumaival fertőzött csoportok szöveti perzisztencia vizsgálatainak 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.

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.

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.

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.

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).

Megbeszélés

***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 kevésbé hatékonyan 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 halálózásra 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. 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). Érdemes 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. 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 6. napon, mint a 2. napon.

A miokardiumban az endokardium érintettsége nélkül kialakuló nagy, multifokális fungális léziók hematogén eredetre utalnak; a fertőzést követő 1. napon valamennyi *C. auris* izolátummal fertőzött csoport esetében megfigyelhető voltak a koszorúerekben megtapadó gombasejt csoportok. Eredményeink összhangban vannak azon tanulmányok eredményeivel, ahol a dél-amerikai és dél-ázsiai kládból származó *C. auris* izolátumokkal fertőzött BALB/c, A/J, neutrofil elasztáziányos, 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 2. 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, 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 szívizomelégtelenség 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 (2×10^8 CFU/g) és az agy (2×10^6 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 ebben az egermodell kísérletben 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.

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). Ebben a neutropeniás egérmódellet kísérletünkben 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. 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, amit a szövettani vizsgálatok is alátámasztottak, ami az egerek hosszabb túléléséhez vezetett. Az AMB hatástalan volt a központi idegrendszer sterilizálása tekintetében, amint azt a 6. 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 fungisztatikus hatású volt a vese gombaterhelését vizsgáló neutropeniás egérmódellet 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 neutropeniás egérmódelletben, 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 neutropeniás 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 2 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;). 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; Alatom 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 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 halálzásáért. A fertőzést követő 2. napon felboncolt egyedek szövettani vizsgálatai 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). 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 szérumban, 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 szembetűnő 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 6. 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 vizsgálataiban során sem a szívben, sem pedig a

vesében nem voltak gombasejtek, de a nagyagyban és a kisagyban 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. 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 és a vizeletben csökkentse, vagy adott esetben teljes mértékben eliminálja azokat, de a központi idegrendszerből 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 dózisével 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 ellenőrizzék 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 ölü hatása miatt növeli a szív-, a szem- vagy a központi idegrendszeri fertőzés kockázatát, ami további szövődményekhez vezet. 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 dózisével terápia 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). Az AMB kezelést azonban korlátozza az infúzióval összefüggő akut toxicitás (azaz mellkasi fájdalom, láz és hypoxia) és a dóziszfüggő nefrotoxicitás (azaz veseelégtelenség, azotémia és hypokalaemia) (Lewis és mtsai. 2003).

Összefoglalás

Globális terjedésének köszönhetően a 2010-es évek végére több kontinensen jegyezték a *C. auris*-hoz, ehhez a multidrog-rezisztens opportunista 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.

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 támogattott 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.



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

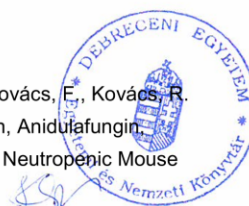
Jelölt: Forgács Lajos
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

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.

