

# **EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

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

**Dr. Saleh Qasem**

**Témavezető: Dr. Majoros László**



**DEBRECENI EGYETEM**

**GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2017**

## Tartalom

2. Előszó.....	4
3. Irodalmi háttér.....	5
3.1. A <i>Candida</i> fertőzések patogenezise.....	5
3.2. A <i>Candida</i> fertőzések epidemiológiája.....	6
3.3. Ritkábban előforduló <i>Candida</i> fajok .....	9
3.4 Echinocandinok.....	11
3.5. Az echinocandin rezisztencia.....	13
3.6. A szérum echinocandin farmakodinámiára kifejtett hatása .....	15
3.7. Az echinocandinok fajspecifikus klinikai határértékei .....	17
3.8. Az echinocandinok hatékonysága különböző betegcsoportokban.....	19
4. Célkitűzések.....	22
5. Anyagok és módszerek .....	23
5.1. A sarjadzó gombák eredete és azonosítása .....	23
5.2. Mikafungin minimális gátló koncentráció meghatározása .....	23
5.3. Az idő-ölés görbék felvétele .....	24
5.4. Az ölési ráta meghatározása.....	25
5.5. <i>In vivo</i> kísérletek .....	26
6. Eredmények .....	28
6.1. Izolátumok MIC értékei .....	28
6.2. Az idő-ölés görbék eredményei a <i>Candida albicans</i> komplex esetén .....	29
6.3. <i>In vivo</i> kísérletek eredményei .....	34
6.4. Az idő-ölés görbék eredményei <i>Candida kefyr</i> , <i>Candida lusitaniae</i> és <i>Candida guilliermondii</i> esetén.....	35
7. Megbeszélés.....	39
8. Eredmények összefoglalása .....	47
9. Tárgyszavak .....	49
10. Köszönetnyilvánítás .....	50
11. Irodalomjegyzék .....	51
12. Mellékletek .....	60
13. Függelék.....	62

## Rövidítések jegyzéke

AMB	Amfotericin B
ANI	Anidulafungin
AUC	Area under the concentration curve
ATCC	American Type Culture Collection
CAS	Kaspofungin
CFU	Colony forming unit
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
$C_{max}$	A gyógyszer csúcskoncentrációja
$C_{min}$	A gyógyszer legalacsonyabb koncentrációja
ECOFF	Epidemiological cutoff value
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FKS:	$\beta$ -1,3-D-glükán-szintetáz enzimkomplex
FLU	Flukonazol
IDSA	Infectious Diseases Society of America
MIC	Minimal inhibitory concentration
MICA	Mikafungin
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PAFE	Postantifungal effect
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

## 2. 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 alapbetegségben szenvedő betegeknél 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 gyógyszercsoport (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, kaszopofungin 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.

### 3. Irodalmi háttér

#### 3.1. A *Candida* fertőzések patogenezeise

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 (Lockhart és mtsai. 2007; Martin és mtsai. 2003; Vincent és mtsai. 2009; Wisplinghoff és mtsai. 2004). 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 (Martin és mtsai. 2003; Vincent és mtsai. 2009; Wisplinghoff és mtsai. 2004). A *Candida* fajok általi kolonizáció jól magyarázható a különböző virulencia faktorok előfordulásával illetve azzal, hogy kis csíraszámban a szájüregben, a vastagbélben és a hüvelyben a normál flóra részét képezik. A kolonizációban az ALS fehérje család (agglutinin-like sequence) (Murciano és mtsai. 2012; Verstrepen és Klis. 2006), a hifa-asszociált Hwp1 fehérje (Mayer és mtsai. 2013), valamint a különböző szekretált aszpartil proteinázok a fontosak, míg az invázióban a szekretált aszpartil proteinázok, a foszfolipázok és a lipázok játszanak döntő szerepet (Parra-Ortega és mtsai. 2009; Silva és mtsai. 2014; Wachtler és mtsai. 2012). A *Candida albicans* és a *C. dubliniensis* fajok, az egysejtű (élesztő) forma mellett hifát is képeznek, amelynek a virulenciában játszott szerepe jól ismert (Moran és mtsai. 2002).

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 (Kett és mtsai. 2011; Martin és mtsai. 2003; Pfaller és mtsai. 2012). A centrális és perifériás katéterek által okozott, úgynevezett katéter-asszociált fertőzések patogenezisében fontos a kórokozó biofilmet létrehozó képessége (Nobile és mtsai. 2008; Trofa és mtsai. 2008). 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 predisponál az invazív *Candida* fertőzések kialakulására (Pfaller és mtsai. 2012).

### 3.2. A *Candida* fertőzések epidemiológiája

Wisplinghoff és munkatársai az 1995-2002 közötti időszakban 24179 darab véráramfertőzést vizsgáltak az Amerikai Egyesült Államok kórházaiban. Bár a leggyakoribb véráram fertőző kórokozók továbbra is a Gram-pozitív baktériumok (koaguláz-negatív *Staphylococcusok*: 31,3%, *S. aureus*: 20,2%, *Enterococcus* fajok: 9,4%) voltak, a negyedik leggyakrabban izolált kórokozókká a különböző *Candida* fajok léptek elő (9%). Az összes kórokozót figyelembe véve a *Candida* fajok esetén volt a legmagasabb a mortalitás (39,2%), megelőzve a *S. aureus* (25,4%), a *Pseudomonas aeruginosa* (38,7%) és az *Acinetobacter baumannii* (34%) fajokat is. Az 1890 *Candida* izolátum közül a *C. albicans* volt a leggyakoribb (54%), amelyet a *C. glabrata* (19%), a *C. parapsilosis* és a *C. tropicalis* (11-11%) illetve a *C. krusei* (2,4%) követték. A vizsgált időszakban másfélszeres növekedést észleltek a véráram *Candida* fertőzéseit tekintve (Wisplinghoff és mtsai. 2004).

Az invazív *Candida* fertőzések megnövelik a kórházi tartózkodás idejét és a jelentős költségnövekedés ellenére a mortalitás még mindig jelentős (Lortholary és mtsai. 2014; Pappas és mtsai. 2016; Pfaller és Diekema. 2007). A leggyakoribb *Candida* faj még mindig a *C. albicans*, de a nem-*C. albicans* fajok okozta invazív fertőzések száma az utóbbi 3 évtizedben folyamatosan növekszik. A nem-*C. albicans* fajok előretörésében a flukonazolnak (FLU) az 1991-es, illetve az első (kaszpofungin) (CAS) majd a további két (mikafungin és anidulafungin) echinocandinnak, a 10 évvel későbbi bevezetése a terápiás gyakorlatba egyaránt szerepet játszik (Farmakiotis és mtsai. 2014; Sipsas és mtsai. 2009).

A profilaktikusan vagy terápiásan alkalmazott antifungális szerek hatását a fajösszetétel megváltozására Sipsas és munkatársainak 2009-ben publikált vizsgálatai mutatják (**1. táblázat**).

Az első időszak (1988-1992) fajeloszlására az 1991-ben bevezetett FLU valószínűleg csekély hatással volt, de megjegyzést érdemel a *C. albicans* alacsonyabb előfordulási

gyakorisága, ami az akkor elérhető azol profilaxissal illetve terápiával magyarázható (pl. mikonazol és ketokonazol). A második időszak (1993-2002) egyértelműen a FLU hatását mutatja az epidemiológiára, hiszen a FLU iránt primer (*C. krusei*) és szekunder (*C. glabrata*) rezisztenciával rendelkező fajok nagymértékű előretörése látható. Mindeközben, a FLU iránt érzékeny *C. albicans* és *C. tropicalis* okozta invazív megbetegedések száma csökkent. A harmadik vizsgált időszakban (2003-2007) a CAS széleskörű használata miatt csökkent az echinocandinok iránt nagymértékben érzékeny *C. glabrata* gyakorisága (5%!), de az echinocandinok iránt csökkent érzékenységgel rendelkező *C. parapsilosis sensu lato* gyakorisága növekedett. A *C. krusei* prevalenciája stabilan magas maradt, míg a *C. tropicalis* gyakorisága több mint a kétszeresére nőtt. (**1. táblázat**).

**1. táblázat** Vérképzőrendszeri daganatos betegekből illetve összejt transzplantáción átesett betegekből izolált *Candida* fajok megoszlása (University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston).

Faj	Betegek száma (%)		
	1988-1992 N=230	1993-2002 N=281	2003-2007 N=173
<i>C. albicans</i>	79 (34)	38 (13)	41 (24)
<i>C. glabrata</i>	28 (12)	<b>86 (31)</b>	8 (5)
<i>C. krusei</i>	17 (7)	<b>68 (24)</b>	30 (17)
<i>C. parapsilosis</i>	33 (14)	39 (14)	<b>42 (24)</b>
<i>C. tropicalis</i>	53 (23)	27 (10)	<b>37 (21)</b>
<i>C. guilliermondii</i>	2 (1)	4 (1)	4 (2)
<i>C. lusitaniae</i>	3 (1)	3 (1)	2 (1)
Egyéb <i>Candida</i> fajok	-	-	6 (3)
Többféle <i>Candida</i>	12 (5)	16 (6)	3 (2)

Az echinocandinok és a FLU hatása a nem-*Candida albicans* fajok előtörése szempontjából még szembetűnőbb, ha az antifungális kezelés mellett kialakuló kandidémiák (az ún. áttöréses, vagy breakthrough kandidémia) faj szerinti eloszlását vizsgáljuk (**2. táblázat**). Az egyik adat a korábbiakban említett M. D. Anderson Cancer Centerből (65 beteg) (Wang és mtsai. 2015), a másik pedig, görögországi

hematológiai megbetegedésekkel foglalkozó központokból származik (18 beteg) (Gamaletsou és mtsai. 2014).

Az Amerikai Egyesült Államokból származó tanulmány adatai két szempontból is egyedülállóak. Egyrészt a *C. albicans* csupán 1,5%-ban volt izolálható a betegekből. Másrészt szembevetendő a kitenyésztett fajok változatossága a nem-*C. albicans* fajok esetén. A betegek 74%-a kapott echinocandint (Wang és mtsai, 2015) jelezve, hogy neutropéniás betegeknél az echinocandinok nem minden esetben hatékonyak a ritka *Candida* fajok ellen. A görög tanulmány érdekessége, hogy három esetben (14%) *C. orthopsilosis*-t izoláltak. Négy beteg echinocandint (két páciens vorikonazollal és liposzómális AMB-vel kombinálva), 6 beteg liposzómális AMB-t, míg a többiek FLU-t (4 beteg) és posakonazolt (3 beteg) kaptak (**2. táblázat**). (Gamaletsou és mtsai, 2014).

**2. táblázat.** Antifungális kezelés mellett kialakuló kandidémiák faj szerinti eloszlása malignus hematológiai megbetegedésben szenvedőknél (Gamaletsou és mtsai. 2014; Wang és mtsai. 2015).

Fajok	Betegek száma (%)	
	USA	Görögország
<i>C. parapsilosis</i>	23 (33,3)	<b>10 (48)</b>
<i>C. orthopsilosis</i>	0 (0)	<b>3 (14)</b>
<i>C. tropicalis</i>	16 (23,2)	1 (5)
<i>C. glabrata</i>	12 (17,4)	1 (5)
<i>C. guilliermondii</i>	5 (7,3)	2 (10)
<i>C. kefyr</i>	5 (7,3)	0 (0)
<i>C. lusitaniae</i>	3 (4,4)	0 (0)
<i>C. famata</i>	2 (2,9)	0 (0)
<i>C. krusei</i>	2 (2,9)	1 (5)
<i>C. albicans</i>	<b>1 (1,5)</b>	<b>3 (14)</b>
Összes	n=69	n=21

### 3.3. Ritkábban előforduló *Candida* fajok

Az előző fejezetben felsorolt 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 (Pfaller és Diekema. 2007). A ritkábban előforduló *Candida* fajok jelentősége az azonosítás nehézsége illetve a kevésbé ismert rezisztencia viszonyaik miatt fontos (Moran és mtsai. 2002; Schelenz és mtsai. 2015).

A ritkábban előforduló *Candida* fajok közül kiemelendő a *C. dubliniensis*, amely a molekuláris biológiai vizsgálatok alapján, filogenetikailag rendkívül közel áll a *C. albicans*-hoz (Sullivan és mtsai. 1995). A faj jelentőségét az adja, hogy a *C. albicans*-hoz képest gyorsabban fejleszt ki másodlagos FLU rezisztenciát (Moran és mtsai. 1997; Perea és mtsai. 2002). A *C. dubliniensis in vitro* szérumban 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 (Moran és mtsai. 2012; Sullivan és mtsai. 2004). 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 (Carr és mtsai. 2005; Khan és mtsai. 2012).

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 (Borman és mtsai. 2013; Romeo és Criseo. 2011; Yazdanparast és mtsai. 2015). 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 (Borman és mtsai. 2013; Romeo és Criseo. 2011; Yazdanparast és mtsai. 2015).

A *C. guilliermondii* hasonlóan az előző két fajhoz (*C. dubliniensis* és *C. africana*) kevesebb, mint 1%-ban tenyészik ki invazív *Candida* fertőzésekből, de Dél-Amerikában akár a kandidémiák 3-5%-ért is felelős lehet (Pfaller és Diekema. 2007). A FLU iránt csökkent érzékenységet mutathat illetve természetes, csökkent érzékenységgel rendelkezik az echinocandinok iránt (Chen és mtsai. 2011; Cheng és mtsai. 2017). Klinikai jelentőségét az adja, hogy invazív fertőzések esetén egyidejű immunszuppresszió is gyakori, ami leukémiás betegek esetén az esetleges csökkent antifungális érzékenység miatt korlátozza a terápiásan adható antifungális szerek számát (Marcos-Zambrano és mtsai. 2017; Pfaller és mtsai. 2012).

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 (Pfaller és Diekema. 2007). 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 (Hamill. 2013). 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 (Pfaller és mtsai. 2012), de malignus hematológiai betegek esetén, akik főleg echinocandin kezelésben részesültek jóval 50% feletti a halálozás (Jung és mtsai. 2015).

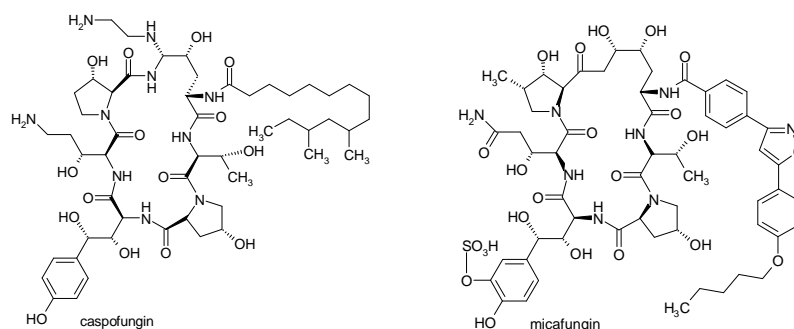
A *C. kefyr*-t először 1909-ben, kefirből izolálták (Dufresne és mtsai. 2014). A 2004-2008 közötti Észak Amerikai (PATH Alliance Registry) felmérésben, az 5526 invazív *Candida* fertőzésből csupán 11 esetben (0,2%) izolálták (Pfaller és mtsai. 2012). A legújabb adatok alapján hematológiai daganatos megbetegedésben 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.*

*C. kefyr* a tejtermékek romlásáért felel, így a nem megfelelő hűtlánc segítheti a malignus hematológiai betegségben szenvedők kolonizációját (Dufresne és mtsai. 2014; Staab és mtsai. 2014). 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 (Dufresne és mtsai. 2014; Staab és mtsai. 2014).

### 3. 4 Echinocandinok

Az echinocandinok ciklikus lipopeptidek, melyek nem-kompetitív módon gátolják a  $\beta$ -1,3-D-glükán-szintáz enzimkomplexet. A sejtfal szintézisének a gátlása ozmotikus instabilitáshoz majd a sejt halálához vezet (Chen és mtsai. 2011). A glükán-szintáz a gomba sejtmembránjában található, két alegységből (Fksp, Rho) álló enzimkomplex. A Rho GTP-kötő protein és a glükán-szintetázt szabályozza. A három gén által kódolt (FKS1, FKS2, FKS3) Fksp katalizálja a cukor egységek szállítását az aktivált donor molekulákról (UDP-glükóz) az akceptor molekulákra. Az FKS2 transzkripciója calcineurin függő. Az FKS3 gén transzkripciója a másik két génhez képest elenyésző (Chen és mtsai. 2011; Perlin 2014).

1. ábra A kaszopfungin és a mikafungin szerkezeti képlete (Dr. Kardos Gábor jóvoltából).



Jelenleg három echinocandin kapható a kereskedelmi forgalomban. A CAS (1. ábra) a *Glarea lozoyensis* fermentlevéből izolált pneumocandin B módosított változata. Az anidulafungin (ANI) 2006 óta van forgalomban, az *Aspergillus nidulans* által termelt echinocandin B módosított formája. A mikafungin (MICA) a *Coleophoma empedri*

pneumocandin A0 molekulájának modifikált változata (**1. ábra**), és 2004-ben engedélyezték a használatát (Chen és mtsai. 2011).

RPMI-1640 tápközegben az echinocandinok a legtöbb *Candida* faj ellen fungicid, míg az *Aspergillus* fajok ellen fungisztikus hatást mutatnak. Hatástalanok *C. neoformans*, a *Fusarium* fajok és a járomspórás gombák (*Zygomycetes*) ellen (Chen és mtsai. 2011). Az egyes *Candida* fajok echinocandinok iránti MIC értéke általában alacsony (0,03-0,06 mg/L), de *C. parapsilosis* és *C. guilliermondii* esetén a MIC érték akár a százszorosa is lehet a *C. albicans* esetén tapasztalt alacsonyabb MIC értékeknek. Ennek ellenére az echinocandinok e két magasabb MIC értékkel rendelkező faj ellen is jó klinikai hatékonyságot mutatnak (Pfaller és mtsai. 2011/a). Az echinocandinok hatásosak invazív *Candida* fertőzések kezelésére és az AMB-vel összehasonlítva jóval kevesebb mellékhatással kell számolni (Pappas és mtsai. 2016). Az echinocandinok hatékonynak bizonyultak gyermekek, sőt újszülöttek invazív *Candida* fertőzéseinek a kezelésében is (Chen és mtsai. 2011; Pappas és mtsai. 2016).

Csak intravénásan alkalmazhatók, a napi egyszeri adagolás az ajánlott. Felnőtteknél CAS és ANI esetén 70 illetve 200 mg-os első napi telítő dózist kell adni, amit CAS esetén 50 illetve ANI esetén 100 mg-os fenntartó napi dózisok követnek. MICA esetén telítő dózis nem kell, napi 100 mg az ajánlott terápia (Pappas és mtsai. 2016). Az itt leírt ajánlott napi dózisokat standard napi dózisként is nevezik.

Az echinocandinok klinikai hatékonysága az AUC/MIC illetve, kisebb mértékben, a  $C_{max}/MIC$  farmakodinámiai paraméterekkel áll szoros összefüggésben (Hope és Drusano 2009; Louie és mtsai. 2005). Az echinocandinok kiváló hatékonyságához két tényező járulhat hozzá. Az egyik a hosszú posztantifungális hatás (PAFE), a másik, pedig a gyógyszercsoport jellegzetes farmakokinetikája.

A PAFE azt jelenti, hogy amikor a gyógyszer koncentrációja a MIC érték alá csökken, a kórokozó szaporodása továbbra is gátolt marad. Az echinocandinok esetén fajtól függően általában hosszú PAFE-vel lehet számolni (>12 óra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* és *C. parapsilosis*), (Chen és mtsai. 2011; Lepak és Andes. 2014; Perlin 2014), míg más fajoknál (*C. guilliermondii*, *C. kefyr*, és *C. lusitaniae*) nem tapasztaltak PAFE-t (Di Bonaventura és mtsai. 2004).

Az echinocandinok farmakokinetikáját legrészletesebben CAS esetében vizsgálták. Az egyszeri és többszörös dózis beadását követően a gyógyszer plazmakoncentrációja

polifázikus csökkenést mutat. Közvetlenül az infúziót követően egy rövid disztribúciós fázis ( $\alpha$ -fázis), majd egy dóziszfüggő, 6-48 óráig tartó  $\beta$ -fázis következik. A magasabb dózisoknál, 2-3 napig tartó  $\gamma$ -fázis is megfigyelhető (Stone és mtsai. 2002).

A CAS farmakokinetikájának még pontosabb megértését (és a másik két echinocandinét is) Louie és munkatársainak (2005) a vizsgálatai segítették, akik a CAS terminális féléletidejét határozták meg egér modellben. Ha csak a szérumban lévő gyógyszer mennyiség időbeli változását vizsgálták, a féléletidő 20,2 óra volt. Amikor azonban, figyelembe vették a vesékben lévő CAS-t is, a szérumban és vesékben együttesen mérhető féléletidő 59,2 órára nőtt. Ezt azt jelenti, hogy az intravénásan beadott CAS a vérből a belső szervek (máj, lép, vesék stb.) szöveteibe lép, ott felhalmozódik, és a szervekből, mint rezervoárokból a gyógyszer folyamatosan visszaáramlik a szérumba. Az echinocandinok szöveti akkumulációját más szerzők is bizonyították (Sandhu és mtsai. 2004). Ennek a farmakokinetikának azért van jelentősége, mivel a gombák nemcsak a vérben, hanem a szövetekben is megtalálhatók, így lehetőség van a gombák eliminációjára nemcsak a vérből, hanem a nagy echinocandin koncentrációjú szövetekből is.

### 3.5. Az echinocandin rezisztencia

Az echinocandinok iránti csökkent érzékenység vagy rezisztencia oka az FKS1 gén mutációja, ami aminosav szubsztitúcióhoz vezet az Fks1p alegység két, úgynevezett forró területén, a „hot-spot” (HS) régióban. A „*psilosis*” komplex mindhárom tagja esetén (*C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis*), az Fks1p fehérje 660. pozíciójában bekövetkező prolin-alanin természetes aminosav csere a csökkent érzékenység oka. A *C. guilliermondii* szintén primer, csökkent érzékenységgel rendelkezik az echinocandinok iránt (**4. táblázat**) (Garcia-Effron és mtsai. 2008).

Az echinocandin terápia során kialakuló másodlagos rezisztencia leggyakrabban *C. glabrata* esetén fordul elő, amelynél az egyidejű FLU rezisztencia aránya is magas (Farmakiotis és mtsai. 2014; Perlin 2014). Egyéb fajoknál a rezisztencia ritka (Perlin. 2014). A **4. táblázat**, a rezisztens izolátumokban megtalálható leggyakoribb aminosav változásokat mutatja. *C. glabrata* esetében az FKS1 és az FKS2 génekben

bekövetkező mutációk egyaránt szerepet játszanak a rezisztencia kialakulásában (Perlin 2014).

Az FKS mutációval rendelkező *C. albicans* izolátumok virulenciája és életképessége alacsonyabb, mint a „vad típusú” izolátumoké illetve *in vitro* csökkent glukán-szintáz aktivitást, megvastagodott sejtfalat és megnövekedett kitin tartalmat észleltek. A szerzők szerint a populációban való széleskörű elterjedésük nem valószínű, így epidemiológiai hatásuk is korlátozott (Ben-Ami és mtsai. 2011). Bár az echinocandinok napi dózisének a növelése a farmakodinámiai jellemzők miatt elméletileg hatékony lehet a rezisztens izolátumok ellen, nem-neutropeniás állatmodellben az emelt dózisok hatástalanok voltak (Wiederhold és mtsai. 2011).

Szerencsére az echinocandinok iránt rezisztens klinikai izolátumoknak a száma világszerte még mindig nagyon alacsony (Farmakiotis és mtsai. 2014; Perlin 2014). Ezért az echinocandin rezisztencia semmiképpen sem magyarázza az invazív *Candida* fertőzések esetén tapasztalható, még mindig igen magas halálozást.

**4. táblázat.** Aminosav változások az FKS gének által kódolt fehérjékben és azok hatása az echinocandin érzékenységre (Perlin. 2014). A „forró területek” első aminosavának a sorszáma jelezve.

Faj	Fks1		Fks2	
	HSP1	HSP2	HSP1	HSP2
<i>C. parapsilosis</i>	F <sub>652</sub> LTLSIRDA	D <sub>1369</sub> WIRRYTL	-	-
<i>C. orthopsilosis</i>	F <sub>39</sub> LTLSIRDA	D <sub>756</sub> WVRRYTL	-	-
<i>C. metapsilosis</i>	F <sub>104</sub> LTLSIRDA	D <sub>821</sub> WIRRYTL	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	F <sub>632</sub> MALSIRDP	D <sub>1347</sub> WIRRYTL	-	-
<i>C. albicans</i>	F <sub>641</sub> LTL <u>SLR</u> DP	D <sub>1357</sub> WIRRYTL	-	-
<i>C. dubliniensis</i>	F <sub>641</sub> LTL <u>SLR</u> DP	D <sub>1357</sub> WIRRYTL	-	-
<i>C. glabrata</i>	F <sub>625</sub> LIL <u>SLR</u> DP	D <sub>1340</sub> WIRRYTL	F <sub>659</sub> LIL <u>SLR</u> DP	D <sub>1374</sub> WIRRYTL
<i>C. tropicalis</i>	F <sub>76</sub> LTL <u>SIR</u> DP	D <sub>792</sub> WIRRYTL	-	-
<i>C. krusei</i>	F <sub>655</sub> LIL <u>SIR</u> DP	D <sub>1364</sub> WIRRYTL	-	-
<i>C. kefyr</i>	F <sub>54</sub> LTL <u>SLR</u> DP	D <sub>769</sub> WIRRYTL	-	-

Félkövér, dőlt betű: természetes polimorfizmus F: Pha, L: Leu, T: Tre, S: Ser, I: Ile, R: Arg,  
Félkövér, nagyobb betű: prominens rezisztencia A: Ala, Y: Tyr, V: Val, P: Pro, W:Trp  
Aláhúzott, nagybetű: a rezisztencia gyenge

### 3.6. A szérum echinocandin farmakodinámiára kifejtett hatása

A *Candida* fajok extracellulárisan elhelyezkedő kórokozók, amelyek a véráram által egyéb belső szervek fertőzéseit okozhatják (Felton és mtsai. 2014). Az antifungális szereknek ezért a fertőzés helyén megfelelő koncentrációban kell jelen lenniük, hogy a gombát eradikálni lehessen. Extracellulárisan elhelyezkedő kórokozók esetén a terápia sikeressége szempontjából az intersticiális folyadék gyógyszer koncentrációja a releváns, ami viszont a szérumban lévő, szabad (fehérjéhez nem kötött) gyógyszer koncentrációjával mutat szoros összefüggést. A gyógyszerek fehérjékhez kötődése fontos a hatékonyság és a mellékhatások szempontjából, mivel csak a fehérjékhez nem kötött, szabad gyógyszer lesz farmakológiailag aktív („szabad gyógyszer” hipotézis). Klinikailag relevánsnak tartják, ha a gyógyszer >85-90%-ban kötődik fehérjékhez (Felton és mtsai. 2014; Gonzalez és mtsai. 2013).

Mindhárom echinocandin nagymértékben kötődik a szérumban lévő fehérjékhez, ami jelentősen megváltoztatja az echinocandinok *in vitro* és *in vivo* aktivitását. A fehérjékhez kötődés mértéke CAS esetén 96,5% (döntően albuminhoz), MICA-nál 99,8% (albuminhoz és alfa-1-savas glikoproteinhez), míg ANI esetében 99%. Ez azt jelenti, hogy a szérumban lévő gyógyszer mennyiségnek csupán 0,2-3,5% lesz szabad, azaz biológiailag aktív formában (Gonzalez és mtsai. 2013). A kevés számú irodalmi közlemény adatai a fenti elméletet alátámasztották, így az echinocandinok aktivitásának a csökkenését tapasztalták a *Candida* és *Aspergillus* fajok esetén (Garcia-Effron és mtsai. 2011; Ishikawa és mtsai. 2009; Odabasi és mtsai. 2007; Paderu és mtsai. 2007).

Paderu és munkatársai (2007) a CAS, a MICA és az ANI hatását vizsgálták klinikai *Candida* izolátumok ellen RPMI-1640+50% humán szérum (=50% szérum) tápközegben. CAS-nál az 50% szérumban mért MIC értékek 1-16-szor voltak magasabbak, mint az RPMI-1640-ben mért MIC értékek. MICA-nál ugyanez az arány 32-128-szoros, míg ANI-nál 8-256-szoros volt. Hasonló mértékű MIC érték emelkedésről számoltak be Odabasi és munkatársai is (2007). A két tanulmány eredményei nem teljesen korreláltak a „szabad gyógyszer hipotézis” elméletével, hiszen a MIC értékeknek az eredetihez képest, 500-1000-szeresére kellett volna növekedniük. Ennek valószínű oka, hogy a fehérjékhez kötődés gyenge, reverzibilis és

a gyógyszer leválva a fehérjékről hozzákapcsolódhat a gombához és kifejtheti antifungális hatását (Gonzalez és mtsai. 2013).

A három echinocandinnak a szérumban mért MIC értékei a *Candida* fajok ellen nagyon közel vannak egymáshoz és a szélső értékek is szűkebb tartományban vannak, mint az RPMI-1640-ben mért MIC értékek (Garcia-Effron és mtsai. 2011; Ishikawa és mtsai. 2009; Paderu és mtsai. 2007). A szérumnak az alkalmazása tehát kiegyenlíti az echinocandinoknak az RPMI-1640-ben mért különböző MIC értékeit, így a három echinocandin esetén az RPMI-1640-ben tapasztalt különböző MIC értékeknek, ugyanazon izolátum ellen valószínűleg nincs jelentősége (Garcia-Effron és mtsai. 2011).

Andes és munkatársai (2010) neutropéniás egerek veséiből kitenyésztett CFU változásból meghatározták a fungisztikus és az egy nagyságrendnyi CFU csökkenéshez szükséges farmakodinámiás targetet a három echinocandinnál *C. albicans*, *C. glabrata* és *C. parapsilosis* esetén. *C. parapsilosis sensu lato* ellen a sztatikus hatáshoz szükséges napi CAS dózis ( $3,56 \pm 3,08$  mg/kg) szignifikánsan kisebb volt, mint ANI ( $51 \pm 35$  mg/kg) és MICA ( $32,3 \pm 24,0$  mg/kg) esetén. Ezek a statisztikailag szignifikáns különbségek teljesen eltűntek, ha a szabad, fehérjékhez nem kötött, echinocandin koncentrációkat használták a farmakodinámiás target, az  $AUC_{0-24h}/MIC$  kiszámításához (a target ANI esetén  $11,5 \pm 10,9$ , CAS esetén  $16,8 \pm 26,4$ , illetve a MICA esetén  $4,95 \pm 3,6$  voltak). Hasonló eredményt kaptak *C. albicans* és *C. glabrata* esetén is.

A szérumban végzett *in vitro* vizsgálatok tehát segíthetnek még pontosabban megérteni az echinocandinok hatásmechanizmusát, így az *in vivo* hatékonyság még pontosabban lenne becsülhető. Továbbá a szérum alapú tápközeg segíthet elkülöníteni a „vad” típusú klinikai izolátumokat az ismert másodlagos rezisztenciával rendelkező (terápia során rezisztenssé vált) izolátumoktól is (Garcia-Effron és mtsai. 2011). Sajnos a szérummal végzett érzékenységi vizsgálatok jelenleg nem standardizáltak (Nasar és mtsai. 2013).

### 3.7. Az echinocandinok fajspecifikus klinikai határértékei

Jelenleg két referencia módszer létezik a sarjadzó gombák MIC értékének a mikrohígítós módszerrel történő meghatározására. Az 1997-ben (NCCLS M27-A, 1997), az USA-ban kidolgozott módszer, azóta több revízió is átesett (NCCLS M27-A2, 2002) illetve 2008 óta CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) néven hozzáférhető (CLSI M27-A3, 2008). Az utolsó módosítás 2012-ben történt (M27-A4). A másik érzékenység meghatározási módszer az EUCAST (the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (Arendrup és mtsai. 2012), ami alapjában véve a CLSI módosítása. Mindkét módszer RPMI-1640-et használ tápközegként, pufferként 3-N-morfolino-propánszulfonsav szerepel és a MIC értékeket 35 °C-on való inkubálás után, 24 óra múlva kell leolvasni. Az EUCAST esetén a glukóz tartalom 10-szerese a CLSI esetén használt glukóznak (2% vs. 0,2%) illetve, az EUCAST kezdő csíraszám 100-szorosa ( $\sim 10^5$  CFU/ml) a CLSI kezdő csíraszámának. A két módszerrel 24 órás inkubációs idő után kapott MIC értékek  $\pm 2$  hígítási fokon belül 78,9-99,6%-os egyezést mutatnak (Pfaller és mtsai. 2014). Az EUCAST elsőként vezette be a faj-specifikus klinikai határérték (break-point) fogalmát a sarjadzó gombák esetén, amit azóta a CLSI (2012) is átvett.

A CLSI 2008-ban módosította 2002-es ajánlását az érzékenységi kategóriákra, de még nem használta a fajspecifikus határértékeket, azaz minden *Candida* fajra ugyanaz az érzékenységi kategória vonatkozott. A legérdekesebb kategória a nem-érzékeny kategória volt a három echinocandin esetén (CLSI, 2008). Ennek a kategorizálásnak az volt az oka, hogy a nem sokkal korábban bevezetett echinocandinokkal jó terápiás eredményeket lehetett elérni, még olyan izolátumok esetén is, amelyeknek a MIC értéke 1-2 mg/L volt. Így minden olyan *Candida* izolátumot amelynek a MIC értéke  $\leq 2$  mg/L volt, érzékenynek tekintettek.

A *fajspecifikus klinikai határérték* bevezetése azon a felismerésen alapult, hogy a különböző antifungális szerek MIC értékei szignifikánsan alacsonyabbak néhány faj esetén, mint más fajoknál. Az FKS génben bekövetkező mutációk *C. albicans* vagy *C. glabrata* esetén azonban nem feltétlenül vezetnek jelentősen megemelkedett echinocandin MIC értékhez, tehát akár 2 mg/L alatti MIC értékeket is mérhetünk (Pfaller és mtsai. 2011/a). A  $\leq 2$  mg/L MIC érték pedig ugyanezt az izolátumot érzékenynek kategorizálta volna, a nyilvánvaló terápiás sikertelenség ellenére is.

A 2010-es évek elején az új klinikai határértékek megalkotása során az adott antifungális szer MIC értékeinek a megoszlását a különböző *Candida* fajok esetén, az ismert rezisztencia mechanizmusokat, a farmakokinetikai-farmakodinámiai sajátosságokat és a nemzetközi felmérésekben szereplő klinikai hatékonyságot is figyelembe vették (Pfaller és mtsai. 2011/a). A CLSI (2012) az echinocandinok esetén hat gombafaj esetén tett javaslatot az új fajspecifikus klinikai határértékekre (5. táblázat).

**5. Táblázat.** Az echinocandin antifungális szerek klinikai határértékei a klinikailag fontos *Candida* fajok esetén. (CLSI, M27A-4, 2012)

Faj/antifungális szerek	Klinikai határérték (mg/L)		
	É	M	R
<b><i>C. albicans</i></b>			
Kaszpofungin	≤0,25	0,5	≥1
Anidulafungin	≤0,25	0,5	≥1
Mikafungin	≤0,25	0,5	≥1
<b><i>C. glabrata</i></b>			
Kaszpofungin	≤0,12	0,25	≥0,5
Anidulafungin	≤0,12	0,25	≥0,5
Mikafungin	≤0,06	0,12	≥0,25
<b><i>C. parapsilosis</i></b>			
Kaszpofungin	≤2	4	≥8
Anidulafungin	≤2	4	≥8
Mikafungin	≤2	4	≥8
<b><i>C. tropicalis</i></b>			
Kaszpofungin	≤0,25	0,5	≥1
Anidulafungin	≤0,25	0,5	≥1
Mikafungin	≤0,25	0,5	≥1
<b><i>C. krusei</i></b>			
Kaszpofungin	≤0,25	0,5	≥1
Anidulafungin	≤0,25	0,5	≥1
Mikafungin	≤0,25	0,5	≥1
<b><i>C. guilliermondii</i></b>			
Kaszpofungin	≤2	4	≥8
Anidulafungin	≤2	4	≥8
Mikafungin	≤2	4	≥8

É: érzékeny, M: mérsékelten érzékeny, R: rezisztens

A fajspecifikus határértékek bevezetése az echinocandin rezisztens izolátumok kiszűrése miatt volt fontos, azaz a biztonságos terápia volt a fő cél. Bevezették a mérsékelten érzékeny kategóriát. Figyelembe véve, hogy a CAS MIC érték eloszlása a nemzetközi felmérésekben a különböző központokban nagy szórást mutatott, ma már nem javasolják a CAS MIC rutinszerű meghatározását a mikrobiológiai laboratóriumokban. Helyette, a MICA és/vagy ANI MIC meghatározást kell elvégezni és azoknak az eredményei alapján kell a CAS érzékenységi eredményét a klinikus felé közölni (Espinell-Ingroff és mtsai. 2013). *C. parapsilosis* és a *C. guilliermondii* esetén megmaradt az eredeti, 2 mg/L-es érzékenységi határérték a 3 echinocandin esetén (CLSI, 2012).

A ritkábban előforduló fajok esetén sokkal kevesebb adat állt rendelkezésre, ezért az ún. epidemiológiai határérték (epidemiológiai „cut-off” =ECOFF) segíthet a terápia megtervezésénél. Az ECOFF azt a MIC értéket jelöli, amely magába foglalja a „vad” típusú gomba izolátumok legalább 95 %-ának a MIC értékét (másképpen: a „vad” típusú izolátumok MIC értékének a felső határa). Ennek értéke az előzőek alapján függ a „vad” típusú gomba izolátumok MIC értékének az eloszlásától, a MIC érték móduszától illetve a MIC meghatározási módszerből eredő variabilitástól (CLSI, 2012; Pfaller és mtsai. 2010, 2011/a és b).

### **3.8. Az echinocandinok hatékonysága különböző betegcsoportokban**

Lortholary és munkatársai (2014) párizsi és a Párizs környéki kórházak intenzív terápiás osztályairól riasztó adatokat közöltek az invazív *Candida* fertőzések okozta mortalitásról. Vizsgálatukban a kandidémia gyakorisága az intenzív terápiás osztályokon és nem-intenzív terápiás osztályokon is szignifikáns mértékben növekedett. A szignifikáns növekedésért a nem-intenzív terápiás osztályokon (összesen 1301 kandidémia) a *C. albicans* és a *C. glabrata*, míg az intenzív terápiás osztályokon (összesen 1206 kandidémia) a *C. albicans* volt a felelős. A hatodik leggyakoribb kórokozó mind az intenzív, mind pedig a nem-intenzív terápiás osztályokon is a *C. kefyr* volt (1,7 illetve 1,8%). Az intenzív terápiás osztályokon a FLU terápia a 2003-as évi 64,8%-ról, 2009-re 38,8%-ra csökkent, miközben az echinocandin használat 2003-as évi 4,6%-ról, 48,5%-ra nőtt 2009-re. A korábbi FLU terápia/profilaxis predisponált a *C. krusei*, a *C. tropicalis* és a *C. glabrata*, míg az

echinocandin terápia a *C. parapsilosis*, a *C. krusei*, a *C. kefyr* és a *C. glabrata* okozta véráramfertőzésekre. Az echinocandin használat önmagában négyszeresére fokozta a *C. kefyr* és kétszeresére a *C. krusei* előfordulási gyakoriságát. Mindeközben a halálozás a 2003-as évi 42,7%-ról 53,9%-ra nőtt. Az intenzív terápiás osztályokon a fajspecifikus halálozás 50-50% volt *C. albicans*, *C. glabrata* és *C. tropicalis*, 70% *C. krusei* és *C. kefyr*, míg 30% *C. parapsilosis* esetén. A szerző nem tudott magyarázatot adni ezekre a riasztó adatokra, hiszen az antifungális szerek iránti rezisztencia nem volt jelentős. Azt azonban elképzelhetőnek tartotta, hogy a bakteriális szepszisek hatékonyabb kezelése fokozza a betegek túlélését, akik viszont fokozottan érzékenyek a *Candida* fajok okozta invazív fertőzésekre (Lortholary és mtsai. 2014).

Hasonlóan megdöbbentő adatokat láthattunk a már korábban említett M. D. Anderson Cancer Centerből, Jung és munkatársainak a közleményéből (2015). A szerzők a ritka *Candida* fajok okozta kandidémiákat vizsgálták az 1998-2013 közötti időszakban. A 68 beteg közül 28 betegnél *C. guilliermondii*, 19 betegnél *C. lusitaniae*, 13 betegnél *C. kefyr*, 7 betegnél *C. famata*, illetve egy esetben *C. dubliniensis* tenyésztett ki. A szerzők kiemelték, hogy a *C. dubliniensis* okozta kandidémia a valóságnál ritkábban fordulhatott elő, mivel hagyományos módszerekkel történt az azonosítás. A vizsgált időszakban az évi echinocandin felhasználás szignifikáns mértékben nőtt, és ezzel szoros összefüggésben szignifikánsan emelkedett a *C. lusitaniae* és a *C. kefyr* okozta kandidémiák száma. A 68 beteg közül 37-nél áttöréses (breakthrough) kandidémia alakult ki (16 beteg *C. guilliermondii*, 8 beteg *C. kefyr*, 7 beteg *C. lusitaniae* illetve 6 beteg *C. famata*), akik közül 21 beteg echinocandin kezelést kapott. Ezek a betegek döntően leukémiás, neutropéniás és az intenzív terápiás osztályokon kezelt betegek voltak. A központban a CAS iránti érzékenységet határozták meg, és az ECOFF értékek alapján a *C. kefyr* izolátumok 82%-ka illetve a *C. lusitaniae* izolátumok 21%-ka bizonyult nem „vad” típusúnak. A *C. guilliermondii* izolátumok 87%-ka érzékeny volt CAS iránt. A szerzők kiemelték, hogy a CAS által mért MIC érték nem biztos, hogy releváns, hiszen a rutin MIC meghatározásra a MICA és az ANI javasolt (Espinel-Ingroff és mtsai. 2013). Az áttöréses kandidémiák esetén a 28 napos halálozás 76%-os volt (28/37), ami szignifikánsan magasabb volt, mint a *de novo* kandidémiák esetén (41%, 12/29). A szerzők véleménye szerint a ritka fajok okozta igen magas halálozás (*C. guilliermondii* 59%, *C. lusitaniae* 53%, *C. kefyr* 77%, *C. famata* 57%) nem magyarázható teljesen az FKS génekben bekövetkező mutációkkal,

inkább az ún. klinikai rezisztencia a valószínűbb. A klinikai rezisztencia több tényezőtől függ, beleértve az alaptertséget, a kórokozó tulajdonságait (virulenciáját) illetve a kezelésre használt antifungális szer koncentrációját a fertőzött testtájékon.

## 4. Célkitűzések

Invazív *Candida* fertőzések esetén a jelenlegi ajánlás szerint az echinocandinok az elsőként választandó antifungális szerek. Az echinocandinok terápia 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 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.

## 5. Anyagok és módszerek

### 5.1. 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*, a *C. guilliermondii*, a *C. lusitaniae* és a *C. kefyr* klinikai izolátumokat kandidémiában szenvedő betegek véréből izoláltuk. Fajsztípus azonosításukhoz az API ID 32C (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) és a MICRONAUT-Candida System (Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim, Germany) módszereket használtuk (Szabó és mtsai. 2008). A *C. dubliniensis* és a *C. africana* klinikai izolátumok korábbi tanulmányokból származtak és molekuláris biológiai módszerekkel azonosították őket (Gil-Alonso és mtsai. 2015; Somogyvari és mtsai. 2007). A *C. albicans* komplex vizsgálata esetén egy-egy ATCC tesztörzset is vizsgáltunk.

### 5.2. 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 tápközeget antifungális érzékenység meghatározás esetén. 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) (Garcia-Effron és mtsai. 2011; Ishikawa és mtsai. 2009; Paderu és mtsai. 2007). 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) csöveket is beállítottunk (CLSI M27-A3, 2008; és M27-A4, 2012).

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) (M27-A3, 2008; és M27-A4, 2012). A vizsgált ATCC tesztörzsek MIC értékei mindig a megadott határok között voltak.

*A kísérletekben a 6 faj esetén önállóan végeztem a MIC érték meghatározását a két tápközegben.*

### **5.3. Az idő-ölés görbék felvétele**

Az idő-ölés kísérleteket korábbi munkánk alapján végeztük (Domán és mtsai, 2016; Kovács és mtsai, 2014/a és b). 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  $\mu$ L folyadékot, 1:10-es léptékben, fiziológiás sóoldatban hígítottuk majd a hígításokból Sabouraud-agarok felszínére 4 $\times$ 30  $\mu$ L-t cseppentettünk (Domán és mtsai, 2016; Kovács és mtsai, 2014/a és b). 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 megszámloltuk és a hígítási fokok figyelembe vételével kiszámítottuk az élő gombasejtek számát. A kapott csíraszámokat az idő függvényében grafikusán ábrázoltuk (Domán és mtsai, 2016; Kovács és mtsai, 2014/a és b).

Az antifungális szerátvitel jelenségét („antifungal carryover”), a kísérletek előtt 500 CFU/mL kezdő csíraszámmal vizsgáltuk meg. A táptalaj, a gyógyszer és a gombaszuszpenzió megfelelő mennyiségeinek összemérése után 4 $\times$ 30  $\mu$ L-t Sabouraud-agarra oltottunk és 48 órás inkubálást követően meghatároztuk a kinőtt telepszámot. Antifungális szerátvitelről akkor beszélünk, ha a különböző gyógyszer koncentrációkon tenyésztett izolátumoknál a kontrollhoz képest 25%-kal kisebb CFU

értéket tapasztalunk (Klepser és mtsai. 1998). Az antifungális szerátvitelt nem észleltük a kísérleteink során.

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 MICA-at, ha az életképes sejtek száma a kiindulási sejtszámhoz képest legalább  $\geq 99,9$  %-kal ( $\geq 3$  log) csökkent. Az ennél kisebb ( $< 99,9$  %;  $< 3$  log) mértékű csíraszám csökkenés esetén a hatás fungisztatikus volt (Domán és mtsai. 2016; Kovács és mtsai. 2014/a és b).

*Az idő ölés kísérleteket lehetőség szerint hétfvégenként, reggeli kezdéssel végeztük, így a 0, 4, 8, és 12 órás kioltásokat magam végeztem. A kinőtt telepek számolását és az idő-ölés görbék felvételét magam végeztem.*

#### **5.4. 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 ( $> 0,8$ ) (Cantón és mtsai. 2004; 2013). Az 50%-os és a 99,9%-os sejtszámcsökkenéshez szükséges időt (h) az egyes koncentrációk esetén, a  $T_{50} = 0.30103/k$  illetve a  $T_{99,9} = 3/k$  összefüggés alapján számoltuk ki (Cantón és mtsai. 2004; 2013).

A különböző izolátumok és koncentrációk közötti eltéréseket, a Tukey-féle teszttel kiegészített egyszempontos varianciaanalízissel (one-way ANOVA) vizsgáltuk mindkét tápközegben. Ugyanazon MICA koncentrációk különböző teszközegekben kapott értékeinek összehasonlítását t-próbával végeztük. Szignifikánsnak tekintettük az eredményeket  $p < 0,05$  érték esetén (Domán és mtsai. 2016; Kovács és mtsai. 2014/a és b).

*A statisztikai analízist Dr. Gesztelyi Rudolf segítségével végeztük.*

## 5.5. *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 nőtény, 21-23 grammos egeret használtunk.

Az egerek *tartósan neutropéniás* állapotát ciklofoszfamid (Endoxan, Egyetemi Gyógyszertár, Debrecen) intraperitoneális adagolásával érték el: a fertőzést megelőző negyedik nap 150 mg/kg, a fertőzés előtti első nap 100 mg/kg, a fertőzést követő második és ötödik nap adott 100 mg/kg dózisokat használtunk (Andes és mtsai. 2010; Kovács és mtsai. 2014/a).

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. A felfrissített izolátumokat 3-4 Sabouraud-agar táptalaj felületére szélesztettük. A 24 órás, 35 °C-on történő inkubálás után a kinőtt gombapázsitot a táptalajok felszínéről steril vattatamponnal eltávolítottuk és steril fiziológiás sóoldatban elszuszpendáltuk. A szuszpenziókat 3000 g fordulaton 10 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót eltávolítottuk. A leülepedett gombasejtekhez 25 mL steril fiziológiás sóoldatot pipettáztunk és újabb 10 percen át centrifugáltuk. A mosási folyamatot még 2-szer megismételtük, majd a felülúszó eltávolítása után 8 mL fiziológiás sóoldatot adtunk a gombasejtekhez. A Bürker-kamrában történő számoláshoz, a szuszpenzióból két lépésben 1:100 arányú hígítást készítettünk. A csíraszám beállítást kvantitatív kioltással ellenőriztük (Kovács és mtsai. 2014/a).

Az egereket a laterális farokvénán keresztül fertőztük (0,2 mL gombaszuszpenzió/egér). Az egyes *Candida* fajoknál a beadott dózisokat, előkísérleteink alapján határoztuk meg, vagyis olyan dózist alkalmaztunk, hogy elhullás ne legyen a kontroll állatok között, de a veséikből nagy legyen a kitenyésztett élő gombasejtek száma. *C. albicans* esetén  $6 \times 10^4$  CFU/mL, *C. dubliniensis*-nél  $10^5$  CFU/mL, míg *C. africana* esetén  $10^6$  CFU/mL fertőző dózist használtunk.

Megjegyzést érdemel, hogy a  $2 \times 10^6$  CFU/mL fertőző dózis a *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, majd felboncoltuk. A veséket eltávolítottuk, lemértük majd steril dörzscsészében homogenizáltuk. A homogenizátumhoz 1 mL steril fiziológiás sóoldatot adtunk, majd 1:10-es alapú hígítási sorozatot készítettünk. A különböző hígításokból 100  $\mu$ L-t oltottunk ki Sabouraud-agar táptalajra, majd 48 órás 35°C-on történő inkubálás után a kinőtt telepeket megszámláltuk. A kimutatás alsó határa 100 sejt/szövet (gramm) voltak (Kovács és mtsai. 2014/a).

A táptalajon kitenyészett gombák statisztikai vizsgálatához Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk (GraphPad Prism 4.03, Windows). Szignifikánsnak tekintettük az eredményt  $p < 0,05$  érték esetén (Kovács és mtsai. 2014/a).

*Az oltóanyagok csíraszámának a beállítását magam végeztem. Az egerek boncolásában részt vettem. A statisztikai analízist Dr. Kovács Renátó segítségével végeztük.*

## 6. Eredmények

### 6.1. Izolátumok MIC értékei

A két tápközegben kapott MIC értékek a **6. táblázatban** láthatók.

**6. táblázat.** *Candida* fajok mikafungin MIC értékei a standard makro-leveshígítási módszer alapján. *C. albicans* és *C. guilliermondii* esetén az érzékenységi határértékeket (clinical break-point=CBP) illetve *C. dubliniensis*, *C. kefyr* és *C. lusitaniae* esetén az epidemiológiai határértékeket (ECOFF) feltüntettem (Pfaller és mtsai. 2011/a és b).

Klinikai izolátumok és ATCC tesztörzsek	MIC (mg/L)		Arány*	CBP ill. ECOFF (mg/L)
	RPMI-1640	50 % serum		
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0.03	0.5	16x	≤0,25
<i>C. albicans</i> 183	0.03	1	32x	
<i>C. albicans</i> 5265	0.015	1	64x	
<i>C. africana</i> ATCC 2669	0.015	0.5	32x	-
<i>C. africana</i> 97-135	0.015	0.5	32x	
<i>C. dubliniensis</i> CD36	0.015	1	64x	0.12
<i>C. dubliniensis</i> CBS 8500	0.03	1	32x	
<i>C. dubliniensis</i> 1081	0.06	1	16x	
<i>C. dubliniensis</i> 2953	0.03	0.5	16x	
<i>C. kefyr</i> 4273	0.06	16	256x	0.12
<i>C. kefyr</i> 5243	0.06	8	128x	
<i>C. kefyr</i> 7194	0.12	8	64x	
<i>C. kefyr</i> 8003	0.06	8	128x	
<i>C. lusitaniae</i> 582	0.25	16	64x	0.5
<i>C. lusitaniae</i> 3834	0.12	16	128x	
<i>C. lusitaniae</i> 7849	0.12	16	128x	
<i>C. guilliermondii</i> 5465	1	32	32x	≤2
<i>C. guilliermondii</i> 5540	0.5	32	64x	
<i>C. guilliermondii</i> 21060	1	32	32x	

\*:A MIC értékek arányai (50% szérum/RPMI-1640).

**RPMI-1640-ben** a vizsgált *C. albicans* és *C. guilliermondii* klinikai izolátumok és a *C. albicans* ATCC tesztörzs érzékenynek bizonyultak a MICA iránt (**6. táblázat**). 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 (**6. táblázat**). 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).

## **6.2. 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 (**7. táblázat**).

A fungicid hatás eléréséhez szükséges idő (T<sub>99,9</sub>) 16 és 32 mg/L-en az ATCC tesztörzs esetén 14,54 és 10,29, míg az 5265-ös izolátumnál 4,62 és 4,74 órák voltak. A harmadik *C. albicans* izolátum és a másik két faj ellen a MICA fungisztatikus hatást mutatott (**7. táblázat**). *C. africana* esetén a legnagyobb mértékű csíraszámcsökkenés a 97-135-ös számú izolátumnál következett be (2 log nagyságrendű csökkenés) 32 mg/L-en. Fontos kiemelni, hogy különösen *C. dubliniensis* esetén a fungisztatikus hatás gyenge volt, számos esetben a maximális csíraszámcsökkenés elérése után az izolátumok újránövekedése következett be. Mivel *C. dubliniensis* esetén 99 és a 90%-os csíraszám csökkenést sem észleltünk ezért a három faj esetén csak az 50%-os sejtszámcsökkenéshez (T<sub>50</sub>) szükséges időt mutatom be (**Mellékletek, 1. táblázat**).

**7. táblázat.** Az idő-ölés vizsgálatokban tapasztalható maximális csíraszám (CFU/mL) változás RPMI-1640-ben és 50% szérumban. Negatív előjel csíraszám csökkenést, míg a pozitív előjel növekedést jelent a kezdő csíraszámhoz képest.

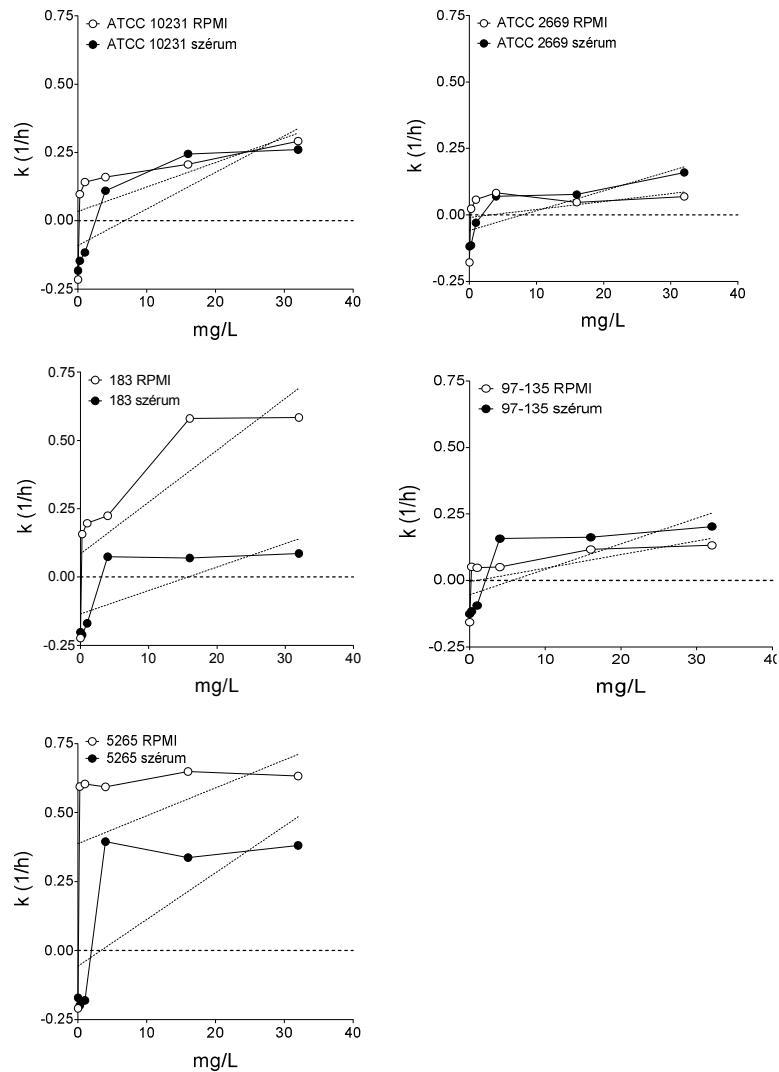
Izolátum száma	Tápközeg	Az idő-ölés vizsgálatokban tapasztalható maximális csíraszám változás (log)				
		0,25	1	4	16	32
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	RPMI-1640	-1,43	-1,78	-1,80	-3,08	-3,08
	50% szérum	+	+	-1,41	-1,43	-1,88
<i>C. albicans</i> 183	RPMI-1640	-0,52*	-0,62*	-0,69*	-1,11*	-1,20*
	50% szérum	+	-0,04*	-0,48	-0,60	-0,38
<i>C. albicans</i> 5265	RPMI-1640	-2,08	-2,08	-2,38	-3,00	-3,60
	50% szérum	+	+	-2,18	-1,88	-1,43*
<i>C. africana</i> ATCC 2669	RPMI-1640	-0,18	-0,43*	-0,61	-0,46*	-0,40*
	50% szérum	+	+	-0,49*	-0,43	-0,69
<i>C. africana</i> 97-135	RPMI-1640	-0,37	-0,43	-0,66	-0,76	-2,00
	50% szérum	+	+	-1,48	-1,78	-3,60
<i>C. dubliniensis</i> CD36	RPMI-1640	-0,14*	-0,21	-0,30	-0,38*	-0,90
	50% szérum	+	+	-0,93	-0,60	-0,93
<i>C. dubliniensis</i> CBS 8500	RPMI-1640	-0,04*	-0,18*	-0,16*	-0,30*	-0,43*
	50% szérum	+	+	-0,48	-0,60	-0,78
<i>C. dubliniensis</i> 1081	RPMI-1640	-0,12*	-0,29*	-0,15*	-0,30*	-0,39*
	50% szérum	+	-0,03*	-0,94*	-0,38*	-0,60
<i>C. dubliniensis</i> 2953	RPMI-1640	+	-0,14*	-0,20*	-0,23*	-0,33*
	50% szérum	+	+	-0,60	-0,42	-0,78

\* Újranövekedés következett be

Az ölés dinamikáját az **ölési ráta** ( $k$ ) értékek alapján lehet pontosabban elemezni. 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 (**2. ábra**).

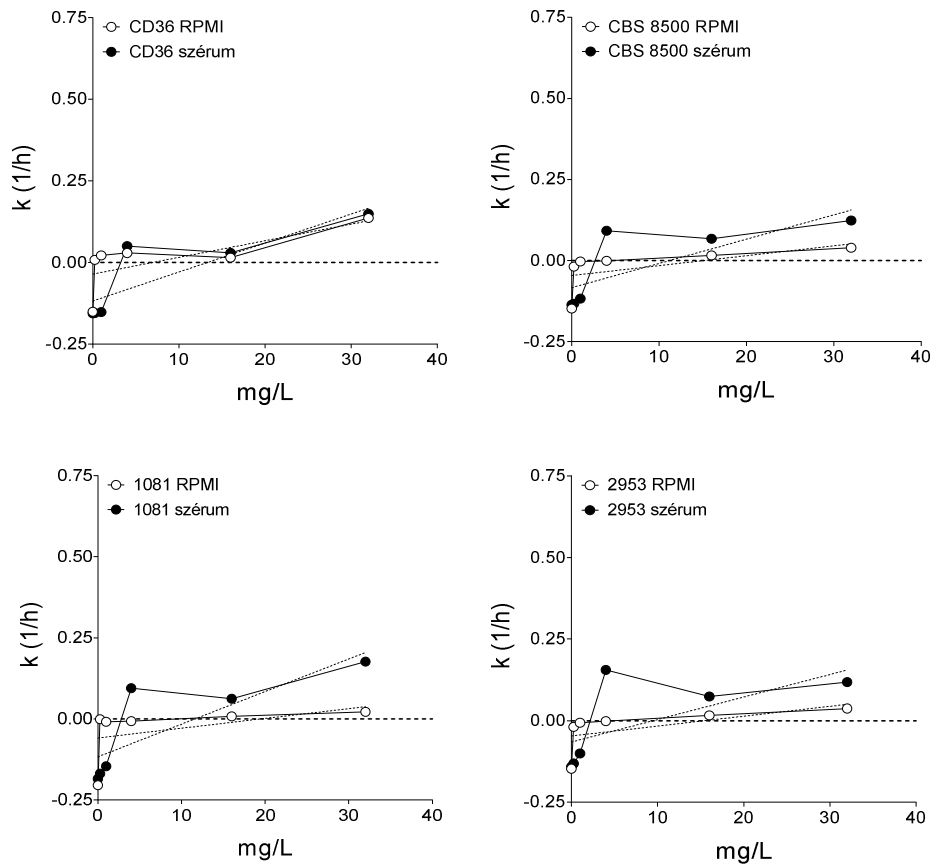
**2. ábra.** A mikafungin által kifejtett ölési ráta a *C. albicans* (bal oldal) és a *C. africana* (jobb oldal) klinikai izolátumok és ATCC tesztörzsek esetén RPMI-1640-ben (RPMI) valamint 50% humán szérumban (szérumban) tápközegekben. A szaggatott vonal a regressziós egyenest szimbolizálja.



*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 ölési 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) (2. ábra). A MICA ölési 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 (3. ábra).

**3. ábra.** A mikafungin által kifejtett ölési ráta a *C. dubliniensis* esetén RPMI-1640-ben (RPMI) valamint 50% humán szérumban (szérumban) tápközvegekben. A szaggatott vonal a regressziós egyenest szimbolizálja.



**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 tápközvegekben ( $P>0,05$ ). Ezzel ellentétben a *C. africana* ATCC tesztörzs és a klinikai izolátum 1 nagyságrendnyi növekedéséhez szükséges idő 50% szérumban szignifikánsan nagyobb volt ( $P<0,01$ ) (**8. táblázat**), 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 (**2. és 3. ábra**). A 4, 16 és 32 mg/L MICA által kiváltott ölés fajtól, izolátumtól és koncentrációtól függő volt.

**8. táblázat.** A kontroll izolátumok egy nagyságrendnyi növekedéséhez szükséges átlagos idő (óra) a *C. albicans* komplex esetén RPMI-1640 és RPMI-1640+50% szérum (50% szérum) tápközegekben.

Izolátumok	idő (óra)	
	RPMI-1640	50 % szérum
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	4,6	5,5
<i>C. albicans</i> 183	4,5	4,9
<i>C. albicans</i> 5265	4,8	5,8
<i>C. africana</i> ATCC 2669	3,9	6,9
<i>C. africana</i> 97-135	4,8	7,3
<i>C. dubliniensis</i> CD36	6,6	6,4
<i>C. dubliniensis</i> CBS 8500	6,7	7,3
<i>C. dubliniensis</i> 1081	5,5	5,6
<i>C. dubliniensis</i> 2953	8,2	8,9

*C. albicans* ellen a MICA fungisztikus hatása 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) (**2. ábra**).

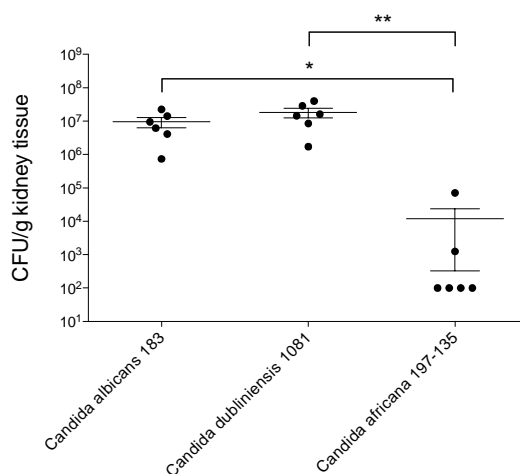
A MICA a *C. africana* ATCC tesztörzs és a klinikai izolátum ellen koncentráció-függő ölü hatást mutatott, azaz a koncentráció emelésével az ölü hatás fokozódott. Mindkét esetben a *k* érték 32 mg/L-en volt a legnagyobb (0,159 illetve 0,20 1/h). A klinikai izolátum ellen a MICA 14,83 óra után fungicid hatású volt (**2. ábra**).

A *C. dubliniensis* esetén 50% szérum, a CD36 típusörzs kivételével 4, 16 és 32 mg/L-en fokozta a MICA ölü hatását ( $P < 0,05-0,001$ ) (**3. ábra**), és a maximális csíraszám csökkenés elérése után újránövekedés is ritkábban fordult elő.

### 6.3. *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 (**4. ábra**). 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*).

**4. ábra.** A *C. albicans*, a *C. dubliniensis* és a *C. africana* egy-egy izolátumának a szaporodóképessége neutropéniás egerek veséiben.



#### 6.4. Az idő-ölés görbék eredményei *Candida kefyr*, *Candida lusitanae* és *Candida guilliermondii* esetén

Az idő-ölés kísérletek eredményei a **9. táblázatban** láthatók.

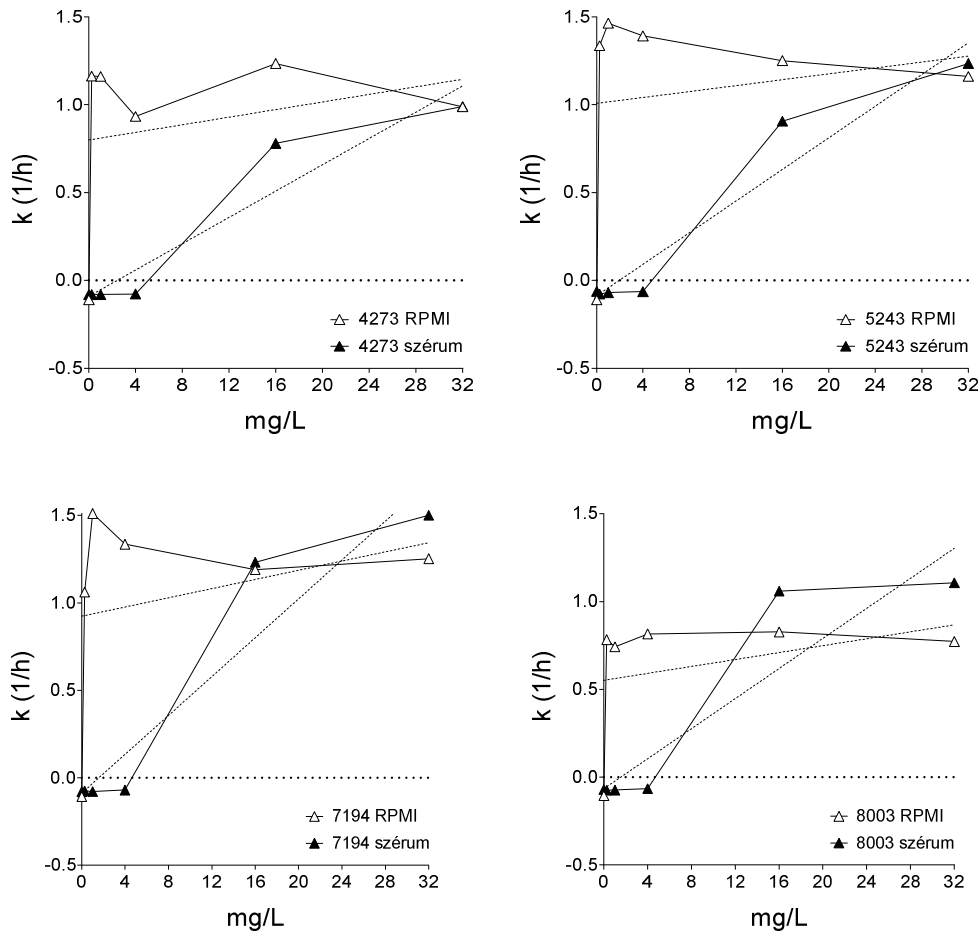
**9. táblázat.** Az idő-ölés vizsgálatokban tapasztalható maximális csíraszám (CFU/mL) változás RPMI-1640-ben és 50% szérumban. Negatív előjel csíraszám csökkenést, míg a pozitív előjel növekedést jelent a kezdő csíraszámhoz képest.

Izolátum száma	Tápközeg	Az idő-ölés vizsgálatokban tapasztalható maximális csíraszám változás (log)				
		0,25	1	4	16	32
<i>C. kefyr</i> 4273	RPMI-1640	-3,30	-3,30	-3,30	-3,30	-3,30
	50% szérum	+	+	+	-2,48	-3,30
<i>C. kefyr</i> 5243	RPMI-1640	-3,78	-3,78	-3,78	-3,78	-3,78
	50% szérum	+	+	+	-2,95	-3,78
<i>C. kefyr</i> 7194	RPMI-1640	-3,78	-3,78	-3,78	-3,78	-3,78
	50% szérum	+	+	+	-3,08	-3,78
<i>C. kefyr</i> 8003	RPMI-1640	-3,78	-3,78	-3,78	-3,78	-3,78
	50% szérum	+	+	+	-2,56*	-3,78
<i>C. lusitanae</i> 582	RPMI-1640	NV	-2,08	-2,12	-2,19	-2,08
	50% szérum	NV	+	+	-0,16*	-0,96*
<i>C. lusitanae</i> 3834	RPMI-1640	NV	-3,78	-3,26	-3,78	-3,78
	50% szérum	NV	+	+	-0,19*	-2,00
<i>C. lusitanae</i> 7849	RPMI-1640	NV	-2,56*	-3,78	-3,78	-3,78
	50% szérum	NV	+	-0,23*	-0,94*	-1,78*
<i>C. guilliermondii</i> 5465	RPMI-1640	NV	-0,29*	-1,07*	-2,44*	-3,38
	50% szérum	NV	+	+	+	+
<i>C. guilliermondii</i> 5540	RPMI-1640	NV	-1,22*	-2,95*	-2,86	-2,90*
	50% szérum	NV	+	+	+	-0,05*
<i>C. guilliermondii</i> 21060	RPMI-1640	NV	-0,52*	-1,65*	-2,71	-3,16
	50% szérum	NV	+	+	+	+

\*Újranövekedést tapasztaltunk, NV: nem végeztük el

RPMI-1640-ben a MICA az összes vizsgált koncentráción  $\leq 4,04$  órán belül fungicid hatású volt mind a 4 *C. kefyr* izolátum ellen (9. táblázat, 5. ábra és a Melléklet 2. táblázata). A MICA ölü aktivitása koncentráció független volt a 4 *C. kefyr* izolátum ellen ( $P > 0,05$ ).

5. ábra. A mikafungin által kifejtett ölési ráta a *Candida kefyr* izolátumok esetén RPMI-1640-ben (RPMI) valamint 50% humán szérumban (szérumban) tápközegekben. A szaggatott vonal a regressziós egyenest szimbolizálja.

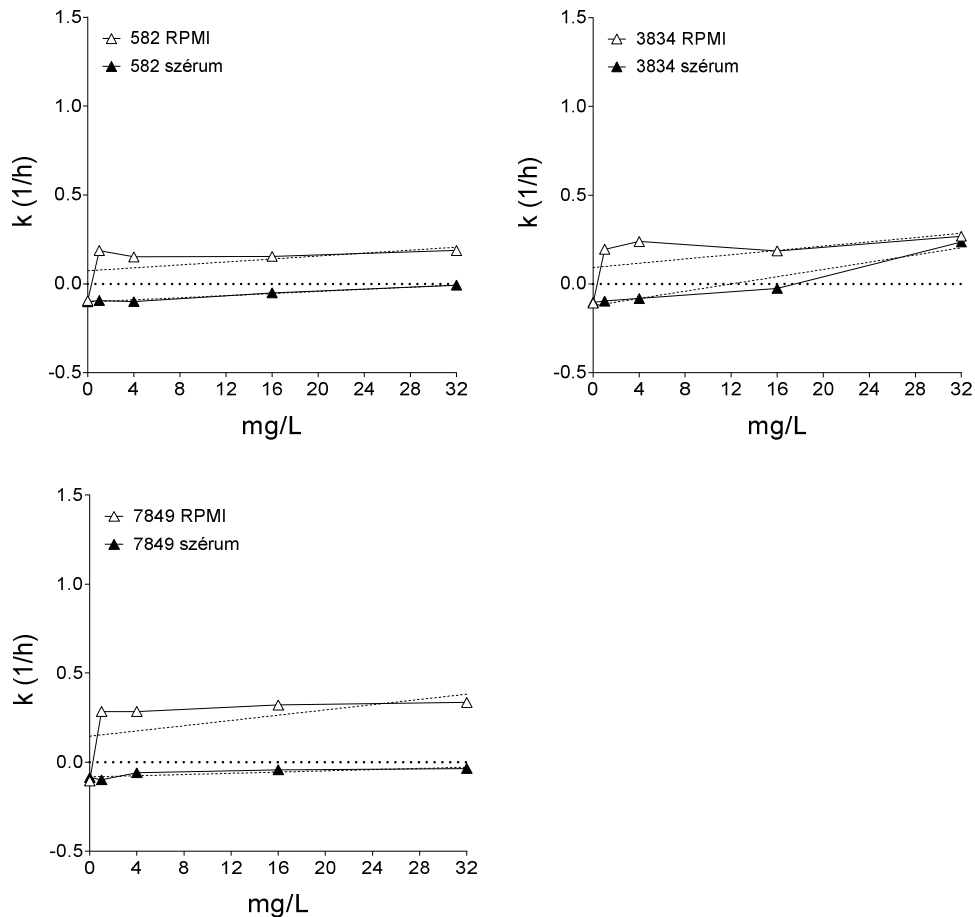


A *C. lusitaniae* 3834 és 7849-es számú izolátumok ellen, RPMI-1640-ben, a MICA  $\geq 4$  mg/L-en 16,10 órán belül szintén fungicid hatást mutatott, míg az 582-es izolátum esetén  $\geq 1$  mg/L-en a hatás fungisztikus volt (Melléklet 2. táblázata). Mindhárom izolátum esetén a MICA ölü hatása koncentrációtól független volt ( $P > 0,05$ ) (6. ábra).

RPMI-1640-ben a MICA csak 32 mg/L-en és csak két *C. guilliermondii* izolátum ellen mutatott fungicid hatást (9. táblázat és a Melléklet 2. táblázata). Mindhárom izolátumnál a maximális csíraszám csökkenés elérése után több koncentráción

újránövekedés volt megfigyelhető. A MICA ölő hatása ebben az esetben is koncentráció-független volt (7. ábra).

**6. ábra.** A mikafungin által kifejtett ölési ráta *Candida lusitaniae* esetén RPMI-1640-ben (RPMI) valamint 50% humán szérumban (szérumban) tápközegekben. A szaggatott vonal a regressziós egyenest szimbolizálja.



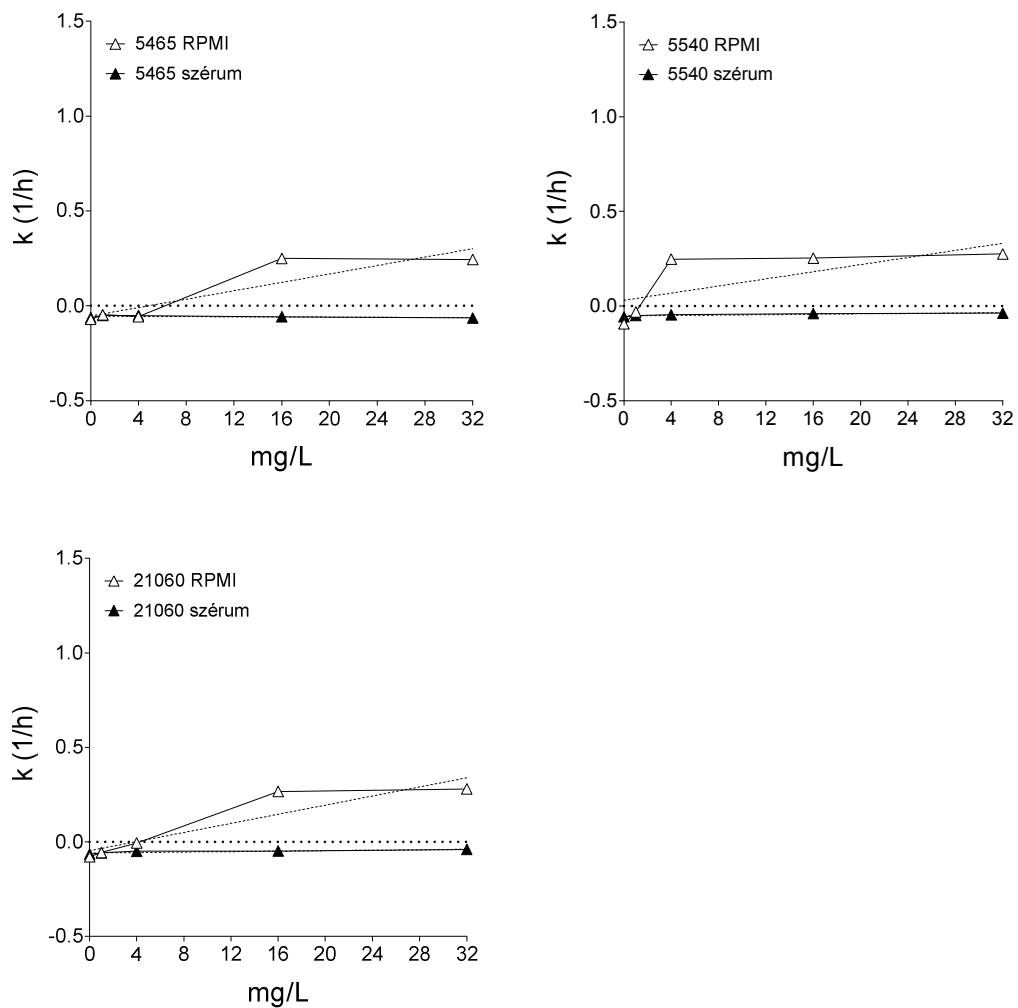
**Ötven százalék szérumban** *C. kefyr* ellen 0,25, 1 és 4 mg/L MICA nem okozott növekedés gátlást, a  $k$  értékek minden esetben negatívak voltak. A két magasabb koncentráción a ölés gyors volt ( $\leq 3,03$  óra), és az ölési ráta értékek nem különböztek szignifikánsan az RPMI-1640-ben mért értékektől (9. táblázat, 5. ábra, Melléklet 2. táblázata).

*C. lusitaniae* ellen a MICA ölő aktivitása a 3834-es számú izolátum kivételével (32 mg/L-en) szignifikánsan csökkent (6. ábra). Még 16 és 32 mg/L MICA esetén is a csíraszám csökkenés csupán átmeneti volt a 2 másik izolátum esetén (9. táblázat). Az

ölési ráta értékek mindig negatívak voltak, kivéve a 3834-es számú izolátumot 32 mg/L-en (6. ábra).

A MICA  $k$  értékek 50% szérumban a *C. guilliermondii* izolátumok ellen mindig negatívak voltak (7. ábra). Átmeneti, minimális (-0,05 log CFU/mL) csíraszámcsökkenés csak az 5540-es számú izolátum esetén fordult elő (9. táblázat, 7. ábra).

7. ábra. A mikafungin által kifejtett ölési ráta a *Candida guilliermondii* klinikai izolátumok esetén RPMI-1640-ben (RPMI) valamint 50% humán szérumban (szérumban) tápközegekben. A szaggatott vonal a regressziós egyenest szimbolizálja.



## 7. Megbeszélés

Az echinocandinok használata 2001-ben, a CAS bevezetésével kezdődött és azóta az elsőként választandó antifungális szerekké váltak az invazív *Candida* fertőzések kezelésében (Pappas és mtsai. 2016). 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 a korábban említett standard napi dózissal elméletileg bármelyik a 3 echinocandin közül, alkalmazható megfelelő indikáció esetén (Pappas és mtsai. 2016).

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 (Pappas és mtsai. 2016; Pfaller és mtsai. 2012). 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 (Felton és mtsai. 2014). 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 diffúziója a szövetekbe, ami a többszervi elégtelenséggel együtt magasabb szérumban lévő echinocandin szintet eredményezhet, miközben a belső szervekben az echinocandin koncentráció alacsonyabb lesz (Felton és mtsai. 2014). Nagymértékű elhízás a nagyobb perctérfogat és vérmennyiség miatt, szintén jelentősen befolyásolja az echinocandinok farmakokinetikáját. A szérumban lévő echinocandin koncentráció kisebb lesz, mivel a hidrofíl echinocandinok a zsírszövetbe penetrálnak, a zsírszövetnek pedig közel 30%-a víz (Zomp és mtsai. 2011).

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 (Goodwin és Drew. 2008; Grau és mtsai. 2015; Hiemenz és mtsai. 2005; Kollef és mtsai. 2012; Lempers és mtsai. 2015; Nguyen és mtsai. 2007; Sasaki és mtsai. 2012; Zomp és mtsai. 2011). Mind a CAS mind pedig a MICA esetén kimutatták, hogy az intenzív terápiás 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 terápiás osztályokon ápoltakhoz képest (Grau és mtsai. 2015; Lempers és mtsai. 2015; Nguyen és mtsai. 2007; Zomp és mtsai. 2011). 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 terápiás osztályokon lévő betegeknél az echinocandinok koncentrációja a szérumban magasabb

lehet az egészséges kontrollokhöz képest, az echinocandinok csökkent eloszlási térfogata és/vagy a csökkent kiválasztása miatt (Nguyen és mtsai. 2007).

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  $\leq 4$  mg/L MICA fungisztatikus vagy fungicid hatású volt (Földi és mtsai. 2012). Ez a szérum koncentráció ( $C_{\min}$ ) napi 100 mg MICA adagolásával könnyen elérhető (Hiemenz és mtsai. 2005; Undre és mtsai. 2012). *C. krusei* és a „psilosis” csoport tagjai ellen csak a 8-32 mg/L MICA bizonyult fungisztatikus vagy fungicid hatásúnak; ezek a koncentrációk csak az emelt napi dózisok (150-300 mg) csúcskoncentrációival ( $C_{\max}$ ) érhetőek el (Goto és mtsai. 2010; Sasaki és mtsai. 2012; Yamada és mtsai. 2011). 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 kompatibilissé váltak egymással (Pfaller és mtsai. 2011/a). 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 egérmodellben 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 (Domán és mtsai. 2016; Kovács és mtsai. 2014/a).

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 (Chen és mtsai. 2011). 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 (**7. ábra**).

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 (Földi és mtsai. 2012). 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 (Goto és mtsai. 2010), a rövid ideig tartó gyógyszer expozíciónak a szérumban nincs csíraszámot csökkentő hatása, ahogy ezt már korábbi munkánkban a CAS esetén is bizonyítottuk (Kovács és mtsai. 2014/b). Eredményeink jól korrelálnak az irodalmi adatokkal, amelyekben a három faj ellen az echinocandinok a neutropéniás egerek veséit még 7-10 napos emelt dózísú echinocandin terápia után sem képesek sterilizálni (Barchiesi és mtsai. 2012; Sanchis és mtsai. 2016; Sandoval-Denis és mtsai. 2014). Bár a három faj virulenciája neutropéniás egérmodellek alapján szignifikánsan alacsonyabb mint a *C. albicans* virulenciája (Barchiesi és mtsai. 2012; Sanchis és mtsai. 2016; Sandoval-Denis és mtsai. 2014), a MICA 50% szérumban mutatott hatástalansága magyarázhatja a tartósan neutropéniás betegek esetén tapasztalt nagymértékű halálozást (Jung és mtsai. 2015). Mindamellet az 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 terápias lehetőségeket (Perlin 2014; Perlin és mtsai. 2015; Pfeiffer és mtsai. 2010).

Ötven százalék szérumban kevésbé drasztikusan változtatta meg a MICA ölő képességét a *C. albicans* izolátumok és az ATCC tesztörzs ellen ( $\geq 4$  mg/L MICA fungisztikus 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 ölő hatása RPMI-1640-ben *C. dubliniensis* ellen annyira gyenge volt, hogy csak a T50 értékeket lehetett a legtöbb koncentráción számolni. A dolgozat egységessége indokolta ezért, hogy a *C. albicans* komplex T50 időpontokra vonatkozó adatai, a *C. kefyr*-re, a *C. lusitaniae*-re és a *C. guilliermondii*-ra vonatkozó T99,9-es adatokkal csak a függelékbe kerültek.

Mivel az echinocandinok hatékonysága klinikailag bizonyított *C. dubliniensis* ellen (Khan és mtsai. 2012; Pfaller és mtsai. 2012), 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 (van Hal és mtsai. 2008). 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 szolgáltatnak 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) (Huang és mtsai. 2014), 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 (Shields. 2014).

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 (Garcia-Effron és mtsai. 2008). 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 dózisének az emelése vagy kombinációs terápia segíthet a beteg állapotának a nem megfelelő javulása esetén (Gumbo 2015; Neofytos és mtsai. 2015; Steinbach és mtsai. 2015).

## 8. Eredmények összefoglalása

Invazív *Candida* fertőzések esetén a jelenlegi ajánlás szerint az echinocandinok (anidulafungin, kaszopofungin 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% szérumban tápközegben *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 hatásának 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 szérumban 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*.

## Summary of the findings

According to the current recommendation, in case of invasive *Candida* infections, echinocandins (anidulafungin, caspofungin and micafungin) are the first antifungal agents to be chosen. Contrary to the therapeutic introduction of the echinocandins, the mortality triggered by the invasive *Candida* infections, especially in case of the less frequently isolated *Candida* species, is still unacceptably high. In my work, by using the minimal inhibition concentration (MIC) and the time-killing curves, the *in vitro* activity of the micafungin was compared against *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. africana*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* and *C. kefyr* isolates in RPMI-1640 and 50% serum.

In RPMI-1640, the *C. albicans* (MIC $\leq$ 0.03 mg/L) and the *C. guilliermondii* (MIC  $\leq$ 1 mg/L) isolates proved to be sensitive to micafungin. In case of *C. dubliniensis* (MIC $\leq$ 0.03 mg/L), *C. lusitaniae* (MIC $\leq$ 0.25 mg/L) and *C. kefyr* (MIC $\leq$ 0.12 mg/L), the MIC values were not higher than the epidemiological limit values. In case of the *C. africana* MIC values of 0.015 mg/L were obtained. The micafungin proved to be of fungicidal or fungistatic effect at values close to the MIC against the species analysed.

In 50% serum, the MIC values increased to 16-64 fold in cases of *C. albicans*, *C. dubliniensis* and *C. africana* compared to the MIC values measured in RPMI-1640 and at the clinically easily achievable concentrations of  $\geq$ 4 mg/L, micafungin proved to be of fungistatic effect. The *C. africana* had very low proliferation rate *in vivo*. The MIC values against *C. kefyr*, *C. lusitaniae* and *C. guilliermondii* increased to 64-256, 64-128 and 32-64 fold, respectively compared to the MIC values measured in RPMI-1640. The killing rate values were positive for *C. kefyr* only at 16 and 32 mg/L, while those for one of the *C. lusitaniae* isolates were positive only at 32 mg/L. In case of the *C. guilliermondii*, the killing rates were negative in each case, even at 32 mg/L.

On the basis of our findings, the species of the less frequently isolated species (*C. kefyr* and *C. lusitaniae*), although the micafungin MIC values obtained in RPMI-1640 may be very close to the MIC values of the species sensitive to the echinocandins, the MIC determination performed in the serum-based substrate and the establishment of the killing curve may exhibit a much more intense response loss than in case of the *Candida* species sensitive to the echinocandins. Therefore, echinocandins shall be used with due care against the rare *Candida* species. On the basis of the three species genetically close to each other (*C. albicans*, *C. dubliniensis* and *C. africana*), the most virulent is the *C. albicans*, while the less virulent is the *C. africana*.

## 9. Tárgyszavak

Echinocandinok, ritka *Candida* fajok, szérumbázisú érzékenységi eljárások, idő-ölés görbék, mikafungin, ölési ráta,

Keywords: echinocandins, rare *Candida* species, serum-based susceptibility testing, time-kill curves, micafungin, killing rate

## 10. 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 értekezésem elhunyt szüleim emlékének ajánlom, akik büszkék lennének az eddig elért sikereimre, megalapozták a jövőmet, útnak indítottak az életben.

## 11. Irodalomjegyzék

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

Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope WW, EUCAST-AFST: **EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST).** *Clin. Microbiol Infect* 2012, **18**:E246–E247.

Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Della Vittoria A, Arzeni D, Manso E et al: **Effects of caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**:2719-2727.

Ben-Ami R, Garcia-Effron G, Lewis RE, Gamarra S, Leventakos K, Perlin DS et al: **Fitness and virulence costs of *Candida albicans* FKS1 hot spot mutations associated with echinocandin resistance.** *J Infect Dis* 2011, **204**:626-635.

Borman AM, Szekely A, Linton CJ, Palmer MD, Brown P, Johnson EM: **Epidemiology, antifungal susceptibility, and pathogenicity of *Candida africana* isolates from the United Kingdom.** *J Clin Microbiol* 2013, **51**:967-72.

Cantón E, Pemán J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A: **Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**:2477-2482.

Cantón E, Pemán J, Hervás D, Espinel-Ingroff A: **Examination of the *in vitro* fungicidal activity of echinocandins against *Candida lusitanae* by time-killing methods.** *J Antimicrob Chemother* 2013, **68**:864-868.

Carr MJ, Clarke S, O'Connell F, Sullivan DJ, Coleman DC, O'Connell B: **First reported case of endocarditis caused by *Candida dubliniensis*.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**:3023-3026.

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

Cheng JW, Liao K, Kudinha T, Yu SY, Xiao M, Wang H1 et al: **Molecular epidemiology and azole resistance mechanism study of *Candida guilliermondii* from a Chinese surveillance system.** *Sci Rep* 2017, **7**:907.

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

Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; 4th informational supplement. CLSI document M27-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.

Di Bonaventura G, Spedicato I, Picciani C, D'Antonio D, Piccolomini R: ***In vitro* pharmacodynamic characteristics of amphotericin B, caspofungin, fluconazole, and voriconazole against bloodstream isolates of infrequent *Candida* species from patients with hematologic malignancies.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**:4453-4456.

Domán M, Kovacs R, Kardos G, Gesztelyi R, Juhasz B, Bozo A et al: **Killing rates of caspofungin in 50 percent serum correlate with caspofungin efficacy against *Candida albicans* in a neutropenic murine model.** *Curr Drug Delivery* 2016, **13**:255-264.

Dufresne SF, Marr KA, Sydnor E, Staab JF, Karp JE. et al: **Epidemiology of *Candida kefyr* in patients with hematologic malignancies.** *J Clin Microbiol* 2014, **52**:1830-1837.

Espinel-Ingroff A, Arendrup MC, Pfaller MA, Bonfietti LX, Bustamante B, Cantón E et al: **Interlaboratory variability of caspofungin MICs for *Candida* spp. using CLSI and EUCAST methods: should the clinical laboratory be testing this agent?** *Antimicrob Agents Chemother* 2013, **57**:5836-5842.

Farmakiotis D, Tarrand JJ, Kontoyiannis DP: **Drug-resistant *Candida glabrata* infection in cancer patients.** *Emerg Infect Dis* 2014, **20**:1833-1840.

Felton T, Troke PF, Hope WW: **Tissue penetration of antifungal agents.** *Clin Microbiol Rev* 2014, **27**:68-88.

Földi R, Szilágyi J, Kardos G, Berényi R, Kovács R, Majoros L: **Effect of 50% human serum on the killing activity of micafungin against eight *Candida* species using time-kill methodology.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012, **73**: 338-342

Gamaletsou MN, Daikos GL, Walsh TJ, Perlin DS, Ortigosa CJ, Psaroulaki A et al: **Breakthrough candidaemia caused by phenotypically susceptible *Candida* spp. in patients with haematological malignancies does not correlate with established interpretive breakpoints.** *Int J Antimicrob Agents* 2014, **44**:248-255.

Garcia-Effron G, Katiyar SK, Park S, Edlind TD, Perlin DS: **A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility.** *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**:2305-2312.

Garcia-Effron G, Park S, Perlin DS: **Improved detection of *Candida* sp. fks hot spot mutants by using the method of the CLSI M27-A3 document with the addition of bovine serum albumin.** *Antimicrob Agents Chemother* 2011, **55**:2245-2255.

Gil-Alonso S, Jauregizar N, Cantón E, Eraso E, Quindós G: **Comparison of the *in vitro* activity of echinocandins against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, and *Candida africana* by time-kill curves.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015, **82**:57-61.

Gonzalez D, Schmidt S, Derendorf H: **Importance of relating efficacy measures to unbound drug concentrations for anti-infective agents.** *Clin Microbiol Rev* 2013, **26**:274–288.

Goodwin ML, Drew RH: **Antifungal serum concentration monitoring: an update.** *J Antimicrob Chemother* 2008, **61**:17-25.

Goto N, Hara T, Tsurumi H, Ogawa K, Kitagawa J, Kanemura N et al: **Efficacy and safety of micafungin for treating febrile neutropenia in hematological malignancies.** *Am J Hematol* 2010, **85**:872-876.

Grau S, Luque S, Campillo N, Samsó E, Rodríguez U, García-Bernedo CA et al: **Plasma and peritoneal fluid population pharmacokinetics of micafungin in post-surgical patients with severe peritonitis.** *J Antimicrob Chemother* 2015, **70**:2854-61.

Gumbo T: **Single or 2-dose micafungin regimen for treatment of invasive candidiasis: therapia sterilisans magna!** *Clin Infect Dis* 2015, **61** Suppl 6:S635-642.

Hamill RJ: **Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity.** *Drugs* 2013, **73**(9):919-934.

Hiemenz J, Cagnoni P, Simpson D, Devine S, Chao N, Keirns J et al: **Pharmacokinetic and maximum tolerated dose study of micafungin in combination with fluconazole versus fluconazole alone for prophylaxis of fungal infections in adult patients undergoing a bone marrow or peripheral stem cell transplant.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:1331-1336.

Hope WW, Drusano GL: **Antifungal pharmacokinetics and pharmacodynamics: bridging from the bench to bedside.** *Clin Microbiol Infect* 2009, **15**:602-612.

Huang LL, Xia HH, Zhu SL: **Ascitic fluid analysis in the differential diagnosis of ascites: focus on cirrhotic ascites.** *J Clin Transl Hepatol.* 2014, **2**:58-64.

Ishikawa J, Maeda T, Matsumura I, Yasumi M, Ujiie H, Masaie H et al: **Antifungal activity of micafungin in serum.** *Antimicrob Agents Chemother* 2009, **53**:4559-4562.

Jung DS, Farmakiotis D, Jiang Y, Tarrand JJ, Kontoyiannis DP: **Uncommon *Candida* species fungemia among cancer patients, Houston, Texas, USA.** *Emerg Infect Dis* 2015, **21**:1942-1950.

Khan Z, Ahmad S, Joseph L, Chandy R: ***Candida dubliniensis*: an appraisal of its clinical significance as a bloodstream pathogen.** *PLoS One* 2012, **7**:e32952.

Kett DH, Azoulay E, Echeverria PM, Vincent JL, Extended Prevalence of Infection in ICU Study (EPIC II) Group of Investigators: ***Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study.** *Crit Care Med* 2011, **39**:665-670.

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

Kollef M, Micek S, Hampton N, Doherty JA, Kumar A: **Septic shock attributed to *Candida* infection: importance of empiric therapy and source control.** *Clin Infect Dis* 2012, **54**:1739-1746.

Kontoyiannis DP, Luna MA, Samuels BI, Bodey GP: **Hepatosplenic candidiasis. A manifestation of chronic disseminated candidiasis.** *Infect Dis Clin North Am* 2000, **14**:721-739.

Kovács R, Gesztelyi R, Berényi R, Domán M, Kardos G, Juhász B et al: **Killing rates exerted by caspofungin in 50% serum and its correlation with *in vivo* efficacy in a neutropenic murine model against *Candida krusei* and *C. inconspicua*.** *J Med Microbiol* 2014/a, **63**:186-194.

Kovacs R, Gesztelyi R, Perlin DS, Kardos G, Doman M, Berenyi R et al: **Killing rates for caspofungin against *Candida albicans* after brief and continuous caspofungin exposure in the presence and absence of serum.** *Mycopathol* 2014/b, **178**:197-206.

Lempers VJ, Schouten JA, Hunfeld NG, Colbers A, van Leeuwen HJ, Burger DM et al: **Altered micafungin pharmacokinetics in intensive care unit patients.** *Antimicrob Agents Chemother* 2015, **59**:4403-9.

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

Lockhart SR, Abramson MA, Beekmann SE, Gallagher G, Riedel S, Diekema DJ et al: **Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004.** *J Clin Microbiol* 2007, **45**:3352-3359.

Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Madec Y, Denoeud-Ndam L, Wolff M et al: **Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010).** *Intensive Care Med* 2014, **40**:1303-1312.

Louie A, Deziel M, Liu W, Drusano MF, Gumbo T, Drusano GL: **Pharmacodynamics of caspofungin in a murine model of systemic candidiasis: importance of persistence of**

**caspofungin in tissues to understanding drug activity.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:5058-5068.

Maki K, Matsumoto S, Watabe E, Iguchi J, Tomishima M, Ohki H et al: **Use of a serum-based antifungal susceptibility assay to predict the in vivo efficacy of novel echinocandin compounds.** *Microbiol Immunol* 2008, **52**:383-391.

Marcos-Zambrano LJ, Puig-Asensio M, Pérez-García F, Escribano P, Sánchez-Carrillo C, Zaragoza O et al: ***Candida guilliermondii* complex is characterized by high antifungal resistance but low mortality in 22 cases of candidemia.** *Antimicrob Agents Chemother* 2017, **61**: doi: 10.1128/AAC.00099-17.

Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M: **The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000.** *N Engl J Med* 2003, **348**:1546-1554.

Mayer FL, Wilson D, Hube B: ***Candida albicans* pathogenicity mechanisms.** *Virulence* 2013, **4**:119-128.

Moran GP, Sullivan DJ, Herman MC, McCreary CE, Harrington BJ, Shanley DB et al: **Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro.** *Antimicrob Agents Chemother* 1997, **41**:617-623.

Moran GP, Sullivan DJ, Coleman DC: **Emergence of non-*Candida albicans* *Candida* species as pathogens.** 2002, p. 37–54. In R. A. Calderone (ed.), *Candida* and candidiasis. ASM Press, Washinton, DC.

Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ: ***Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why is *C. albicans* more pathogenic?** *Int J Microbiol* 2012, **2012**:205921.

Murciano C, Moyes DL, Runglall M, Tobouti P, Islam A, Hoyer LL et al: **Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions.** *PLoS One* 2012, **7**:e33362.

Nasar A, Ryan L, Frei CR, Cota JM, Wiederhold NP: **Influence of serum and albumin on echinocandin in vitro potency and pharmacodynamics.** *Curr Fungal Infect Rep* 2013, **7**:89-95.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards Wayne, Pa.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards Wayne, Pa.

Neofytos D, Huang YT, Cheng K, Cohen N, Perales MA, Barker J et al: **Safety and efficacy of intermittent intravenous administration of high-dose micafungin.** *Clin Infect Dis* 2015, 61 Suppl 6:S652-661.

Nguyen TH, Hoppe-Tichy T, Geiss HK, Rastall AC, Swoboda S, Schmidt J et al: **Factors influencing caspofungin plasma concentrations in patients of a surgical intensive care unit.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **60**:100-6.

Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR et al: **Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation.** *Curr Biol* 2008, **18**:1017-1024.

Odabasi Z, Paetznick V, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L: **Effects of serum on *in vitro* susceptibility testing of echinocandins.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**:4214-4216.

Paderu P, Garcia-Effron G, Balashov S, Delmas G, Park S, Perlin DS: **Serum differentially alters the antifungal properties of echinocandin drugs.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**:2253-2256.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L et al: **Executive summary: Clinical Practice Guideline for the management of candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America.** *Clin Infect Dis* 2016, **62**:409-417.

Parra-Ortega B, Cruz-Torres H, Villa-Tanaca L, Hernández-Rodríguez C: **Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009, **104**:505-512.

Perea S, Lopez-Ribot JL, Wickes BL, Kirkpatrick WR, Dib OP, Bachmann SP et al: **Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis.** *Antimicrob Agents Chemother* 2002, **46**:1695-1703.

Perlin DS: **Echinocandin resistance, susceptibility testing and prophylaxis: implications for patient management.** *Drugs* 2014, **74**:1573-1585.

Perlin DS, Shor E, Zhao Y: **Update on antifungal drug resistance.** *Curr Clin Microbiol Rep* 2015, **2**:84-95.

Pfaller MA, Diekema DJ: **Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem.** *Clin Microbiol Rev* 2007, **20**:133-163.

- Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S et al. **Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the echinocandins and *Candida* spp.** *J Clin Microbiol* 2010, **48**:52-56.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, Arendrup MC, Brown SD, Lockhart SR et al: **Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: Integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria.** *Drug Resist Updat* 2011/a, **14**:164-176.
- Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Jones RN: **Triazole and echinocandin MIC distributions with epidemiological cutoff values for differentiation of wild-type strains from non-wild-type strains of six uncommon species of *Candida*.** *J Clin Microbiol* 2011/b, **49**:3800-3804.
- Pfaller MA, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier-Kriesche HU, Quan SP et al: **Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004-2008.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012, **74**:323-331.
- Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Rhomberg PR, Jones RN: **Comparison of EUCAST and CLSI broth microdilution methods for the susceptibility testing of 10 systemically active antifungal agents when tested against *Candida* spp.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014, **79**:198-204.
- Pfeiffer CD, Garcia-Effron G, Zaas AK, Perfect JR, Perlin DS, Alexander BD: **Breakthrough invasive candidiasis on micafungin.** *J Clin Microbiol* 2010, **48**:2373-2380.
- Romeo O, Criseo G: ***Candida africana* and its closest relatives.** *Mycoses* 2011, **54**:475-486.
- Sanchis M, Martin-Vicente A, Capilla J, Guarro J: **Antifungal therapies in murine infections by *Candida kefyr*.** *Mycoses* 2016, **59**: 253-258.
- Sandoval-Denis M, Pastor FJ, Capilla J, Sutton DA, Fothergill AW, Guarro J: ***In vitro* pharmacodynamics and *in vivo* efficacy of fluconazole, amphotericin B and caspofungin in a murine infection by *Candida lusitanae*.** *Int J Antimicrob Agents* 2014, **43**:161-164.
- Sandhu P, Xu X, Bondiskey PJ, Balani SK, Morris ML, Tang YS et al: **Disposition of caspofungin, a novel antifungal agent, in mice, rats, rabbits, and monkeys.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**:1272-1280.
- Sasaki J, Yamanouchi S, Kudo D, Endo T, Nomura R, Takuma K et al: **Micafungin concentrations in the plasma and burn eschar of severely burned patients.** *Antimicrob Agents Chemother* 2012, **56**:1113-1115.

- Schelenz S, Barnes RA, Barton RC, Cleverley JR, Lucas SB, Kibbler CC et al: **British Society for Medical Mycology best practice recommendations for the diagnosis of serious fungal diseases.** *Lancet Infect Dis* 2015, **15**:461-474.
- Shields RK, Nguyen MH, Press EG, Clancy CJ: **Abdominal candidiasis is a hidden reservoir of echinocandin resistance.** *Antimicrob Agents Chemother* 2014, **58**:7601-7605.
- Silva NC, Nery JM, Dias AL: **Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance.** *Mycoses* 2014, **57**:1-11.
- Sipsas NV, Lewis RE, Tarrand J, Hachem R, Rolston KV, Raad II et al: **Candidemia in patients with hematologic malignancies in the era of new antifungal agents (2001-2007): stable incidence but changing epidemiology of a still frequently lethal infection.** *Cancer* 2009, **115**:4745-4752.
- Somogyvari F, Doczi I, Serly I, Ahmad S, Nagy E: **Rapid discrimination between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by using real-time polymerase chain reaction.** *Diag Microbiol Infect Dis* 2007, **58**:367-369.
- Staab JF, Neofytos D, Rhee P, Jiménez-Ortigosa C, Zhang SX, Perlin DS et al: **Target enzyme mutations confer differential echinocandin susceptibilities in *Candida kefyr*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2014, **58**:5421-5427.
- Steinbach WJ, Lamoth F, Juvvadi PR: **Potential microbiological effects of higher dosing of echinocandins.** *Clin Infect Dis* 2015, **61** Suppl **6**:S669-677.
- Stone JA, Holland SD, Wickersham PJ, Sterrett A, Schwartz M, Bonfiglio C et al: **Single- and multiple-dose pharmacokinetics of caspofungin in healthy men.** *Antimicrob Agents Chemother* 2002, **46**:739-745.
- Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC: ***Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals.** *Microbiology* 1995, **141**:1507-1521.
- Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaïd A, Stokes C, Vaughan C et al: **Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*.** *FEMS Yeast Res* 2004, **4**:369-376.
- Szabó Zs, Tóth B, Kovács M, Kardos G, Maráz A, Rozgonyi F et al: **Evaluation of the new Micronaut-Candida system compared to the API ID32C method for yeast identification.** *J. Clin Microbiol* 2008, **46**:1824-1825.
- Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD: ***Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen.** *Clin Microbiol Rev* 2008, **21**:606-625.

- Undre N, Stevenson P, Baraldi E: **Pharmacokinetics of micafungin in HIV positive patients with confirmed esophageal candidiasis.** *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2012, **37**:31-38.
- van Hal S, Stark JD, Harkness J, Marriott D: ***Candida dubliniensis* meningitis as delayed sequela of treated *C. dubliniensis* fungemia.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**:327-329.
- Verstrepen KJ, Klis FM: **Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts.** *Mol Microbiol* 2006, **60**:5-15.
- Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD et al: **International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units.** *JAMA* 2009, **302**:2323-2329.
- Wächtler B, Citiulo F, Jablonowski N, Förster S, Dalle F, Schaller M et al: ***Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process.** *PLoS One* 2012, **7**:e36952.
- Wang E, Farmakiotis D, Yang D, McCue DA, Kantarjian HM, Kontoyiannis DP et al: **The ever-evolving landscape of candidaemia in patients with acute leukaemia: non-susceptibility to caspofungin and multidrug resistance are associated with increased mortality.** *J Antimicrob Chemother* 2015, **70**:2362-2368.
- Wiederhold NP, Najvar LK, Bocanegra RA, Kirkpatrick WR, Patterson TF: **Caspofungin dose escalation for invasive candidiasis due to resistant *Candida albicans*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2011, **55**:3254-3260.
- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB: **Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study.** *Clin Infect Dis* 2004, **39**:309-317.
- Yamada N, Kumada K, Kishino S, Mochizuki N, Ohno K, Ogura S: **Distribution of micafungin in the tissue fluids of patients with invasive fungal infections.** *J Infect Chemother* 2011, **17**:731-734.
- Yazdanparast SA, Khodavaisy S, Fakhim H, Shokohi T, Haghani I, Nabili M et al: **Molecular characterization of highly susceptible *Candida africana* from vulvovaginal candidiasis.** *Mycopathol* 2015, **180**:317-23.
- Zomp A, Bookstaver PB, Ahmed Y, Turner JE, King C: **Micafungin therapy in a critically ill, morbidly obese patient.** *J Antimicrob Chemother* 2011, **66**:2678-80.

## 12. Mellékletek

**1. táblázat.** A különböző mikafungin koncentrációk (mg/L) által kiváltott, 50%-os csíraszám csökkenés eléréséhez szükséges átlagos idő (T50), RPMI-1640 és RPMI-1640+50% szérum (50% szérum) tápközegekben *C. albicans*, *C. africana* és *C. dubliniensis* esetén. A pozitív jel azt jelenti, hogy a kezdő csíraszámhoz képest növekedést észleltünk.

Izolátum száma	Tápközeg	T50 (óra)				
		0,25	1	4	16	32
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	RPMI-1640	3,09	2,12	1,88	1,46	1,03
	50% szérum	+	+	2,73	1,23	1,16
<i>C. albicans</i> 183	RPMI-1640	1,92	1,53	1,34	0,52	0,52
	50% szérum	+	+	4,05	4,33	3,50
<i>C. albicans</i> 5265	RPMI-1640	0,51	0,49	0,51	0,46	0,48
	50% szérum	+	+	0,76	0,89	0,79
<i>C. africana</i> ATCC 2669	RPMI-1640	13,07	5,22	3,62	6,29	4,37
	50% szérum	+	+	4,29	3,90	1,89
<i>C. africana</i> 97-135	RPMI-1640	5,83	6,28	5,98	2,58	2,78
	50% szérum	+	+	1,91	1,86	1,49
<i>C. dubliniensis</i> CD36	RPMI-1640	38,51	14,22	10,43	20,53	2,22
	50% szérum	NÉ	NÉ	10,03	10,41	2,03
<i>C. dubliniensis</i> CBS 8500	RPMI-1640	NÉ	NÉ	NÉ	18,66	7,64
	50% szérum	+	+	3,27	4,43	2,44
<i>C. dubliniensis</i> 1081	RPMI-1640	+	+	+	37,65	14,06
	50% szérum	+	+	3,18	4,87	1,71
<i>C. dubliniensis</i> 2953	RPMI-1640	+	NÉ	NÉ	NÉ	8,08
	50% szérum	+	+	1,94	4,08	2,54

NÉ: nem érte el

**2 táblázat.** A különböző mikafungin koncentrációk (mg/L) által kiváltott, 99,9%-os csíraszám csökkenés eléréséhez szükséges átlagos idő (T99,9), RPMI-1640 és RPMI-1640+50% szérum (50% szérum) tápközegekben *C. kefyr*, *C. lusitaniae* és *C. guilliermondii* esetén. A pozitív jel azt jelenti, hogy a kezdő csíraszámhoz képest növekedést észleltünk.

Izolátum száma	Tápközeg	T99,9 (óra)				
		0,25	1	4	16	32
<i>C. kefyr</i> 4273	RPMI-1640	3,48	3,49	3,22	2,43	3,04
	50% szérum	+	+	+	NÉ	3,03
<i>C. kefyr</i> 5243	RPMI-1640	2,25	2,05	2,16	2,39	2,58
	50% szérum	+	+	+	NÉ	2,43
<i>C. kefyr</i> 7194	RPMI-1640	2,83	1,99	2,25	2,52	2,39
	50% szérum	+	+	+	2,44	2,00
<i>C. kefyr</i> 8003	RPMI-1640	3,83	4,04	3,68	3,63	3,88
	50% szérum	+	+	+	2,83	2,71
<i>C. lusitaniae</i> 582	RPMI-1640	NV	NÉ	NÉ	NÉ	NÉ
	50% szérum	NV	+	+	+	+
<i>C. lusitaniae</i> 3834	RPMI-1640	NV	15,27	12,53	16,10	11,17
	50% szérum	NV	+	+	+	NÉ
<i>C. lusitaniae</i> 7849	RPMI-1640	NV	NÉ	10,56	9,35	8,96
	50% szérum	NV	+	+	+	+
<i>C. guilliermondii</i> 5465	RPMI-1640	NV	NÉ	NÉ	NÉ	12,30
	50% szérum	NV	+	+	+	+
<i>C. guilliermondii</i> 5540	RPMI-1640	NV	NÉ	NÉ	NÉ	NÉ
	50% szérum	NV	+	+	+	+
<i>C. guilliermondii</i> 21060	RPMI-1640	NV	NÉ	NÉ	NÉ	10,70
	50% szérum	NV	+	+	+	+

NÉ: nem érte el

NV: nem végeztük el

## 13. Függelék



DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



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 lusitanae*, 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)



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. □ Tel.: (52) 410-443  
E-mail: [publikacios@lib.unideb.hu](mailto:publikacios@lib.unideb.hu) □ Honlap: [www.lib.unideb.hu](http://www.lib.unideb.hu)



---

**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 ölő 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*. 17<sup>TH</sup> INTERNATIONAL CONGRESS OF THE HUNGARIAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 2015, **62**:MPP-2