

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**POSAKONAZOL IN VITRO HATÉKONYSÁGÁNAK VIZSGÁLATA
KÜLÖNBÖZŐ MÓDSZEREKKEL, BELEÉRTVE AZ IDŐ-ÖLÉS
GÖRBÉK FELVÉTELÉT IS, A KLINIKAILAG JELENTŐS CANDIDA
FAJOK ELLEN**

Sóczó Ágnes Georgina

Témavezetők: Prof. Dr. Gergely Lajos, Dr. Majoros László



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2009

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Posakonazol in vitro hatékonyságának vizsgálata különböző módszerekkel,
beleértve az idő-ölés görbék felvételét is, a klinikailag jelentős Candida
fajok ellen**

Sóczó Ágnes Georgina

Témavezetők: Prof. Dr. Gergely Lajos, Dr. Majoros László

DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2009

Az értekezés címe: Posakonazol in vitro hatékonyságának vizsgálata különböző módszerekkel, beleértve az idő-ölés görbék felvételét is, a klinikailag jelentős Candida fajok ellen

Doktori Iskola: DE OEC Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezetők: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora, Dr. Majoros László, Ph.D.

A Bíráló Bizottság Elnöke: Prof. Dr. Szegedi Gyula, akadémikus

Opponensek: Prof. Dr. Kovács Péter, kandidátus, Dr. Vágvölgyi Csaba, az MTA doktora

Tagok: Dr. Maráz Anna, Ph.D., Dr. Szentmiklósi József, kandidátus

Az értekezés védésének helyszíne: DE OEC I.sz. Belklinika tanterem

Az értekezés védésének időpontja: 2009. június 16., 13 óra

Bevezetés

Napjainkban egyre növekszik a sarjadzó gombák által okozott invazív és nem invazív fertőzések száma.

Ezek az infekciók különösen a csökkent immunvédekezésű betegeknél válhatnak súlyossá, életet veszélyeztetővé. Ezeknek a pácienseknek a körében a mortalitás fajtól függően akár a 40-80 %-ot is elérheti.

Az 1990-es évektől kezdődően radikális epidemiológiai változást figyelhattunk meg az invazív fertőzések közül kitenyészített sarjadzó gombák megoszlását illetően. A *Candida albicans* ugyan még mindig az első helyen említendő, viszont ezzel egy időben a többi, nem-*C. albicans* *Candida* fajok által okozott megbetegedések száma is megnövekedett.

A fertőzések terjedésének okait abban kereshetjük, hogy egyes betegek hosszan tartó, széles spektrumú antibiotikum kezelést kapnak, az antifungális szereket a gombás fertőzések megelőzésére kiterjedten használják a profilaxisban, valamint a kezelés során rezisztencia is felléphet az egyes antimikotikumokkal szemben. Ez a rezisztencia lehet primer, mint a *Candida krusei* primer rezisztenciája flukonazolra (FLU), illetve szekunder, mint a *Candida glabrata* ugyanezen gyógyszerrel szemben szerzett csökkent érzékenysége. A súlyos sebészeti beavatkozásokon átesett betegek, illetve a kemoterápiában részesülő daganatos betegek ugyancsak fokozottan hajlamosak az invazív sarjadzó-, és penészgombák által okozott fertőzésekre. A túl alacsony vagy a túl magas életkor szintén jól ismert rizikófaktor. Ugyanakkor megemlíthetjük az újabb betegcsoportok (pl. HIV-fertőzött betegek) megjelenését is, mint felelős tényezőt.

Ezzel a szomorú jelenséggel párhuzamosan ugyan nőtt az elérhető antifungális szerek száma is, a mortalitás azonban alig változott az elmúlt évek során.

Az 1990-es évektől egy újabb kutatási hullám kezdődött el, melynek egyik ígéretes gyümölcse az újabb triazolok – úgy mint vorikonazol (VOR) és posakonazol (POS) - és az echinocandinok bevezetése volt.

Ezek az antifungális szerek széles hatásspektrummal rendelkeznek mind a patogén sarjadzó gombák, mind a penészgombák ellen. Bár az azolokat és a triazolokat fungisztatikus hatású szereknek tartják, számos tanulmány írta le a VOR és a POS *in vitro* és *in vivo* fungicid hatását.

Munkámat a Debreceni Egyetem Orvosi- és Egészségügyi Centrumának (DE OEC) Orvosi Mikrobiológiai Intézetében végeztem. Témám kiválasztásában nagy szerepet

játszott az a tény, hogy a POS, mint újabb triazol típusú antifungális szer nem minden szempont alapján volt eddig tanulmányozva a nemzetközi irodalom alapján.

Ezt a gondolatot szem előtt tartva értekezésemben a POS, mint új antifungális szer *in vitro* érzékenységi vizsgálatait végeztem el különböző *Candida* fajok esetében. Kapcsolatot kerestem az egyes *in vitro* érzékenységi vizsgálatok között (nevezetesen levesthígítós módszer és E-teszt), valamint megvizsgáltam a POS *in vitro* érvényesülő ölő hatását a minimális fungicid koncentráció (MFC) meghatározása és az idő-ölés görbe (time-kill curve) segítségével, mellyel kapcsolatosan tudomásom szerint még egyetlen szerző sem közölt adatokat.

Célkitűzések

1. Kísérleteinkben célul tűztük ki az új antifungális szer, a POS és a FLU *in vitro* aktivitásának összehasonlító vizsgálatát a DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézetében izolált, klinikailag jelentősebb *Candida* fajok ellen a standard mikrodilúciós módszer segítségével.
2. Vizsgálatainkban választ kerestünk arra a kérdésre, hogy a CLSI által leírt standard leveshígítási metodikában alkalmazott dimetil-szulfoxid (DMSO), illetve a módosított módszerben leírt polietilén-glikol (PEG) használata a gyógyszer feloldására milyen hatással van a minimális gátlási koncentráció (MIC) értékekre.
3. Célunk volt összehasonlítani a rutin diagnosztikában legszélesebb körben használatos alternatív érzékenység meghatározási módszer, az E-teszt által kapott MIC eredményeket a standard mikrodilúciós módszerrel kapott eredményekkel.
4. Nagyszámú törzs felhasználásával, a klinikailag legjelentősebb *Candida* fajok POS iránti MFC értékeinek meghatározásával választ kerestünk arra a kérdésre, hogy a POS *in vitro* rendelkezik-e fungicid hatással.
5. Megvizsgáltuk, hogy a MFC meghatározásával kapott eredmények milyen korrelációt mutatnak a fungicid vagy fungisztatikus hatás eldöntésére legalkalmasabb idő-ölés görbékkel.

Anyagok és módszerek

Sarjadzó gombák eredete

Kísérleteinkben a DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézetében, a 2002-2005-ig terjedő időszakban izolált *Candida* speciesek közül 209 db törzzsel dolgoztunk (32 db *C. albicans*, 30 db *C. glabrata*, 21 db *Candida tropicalis*, 29 db *C. krusei*, 28 db *Candida parapsilosis*, 50 db *Candida inconspicua*, 13 db *Candida kefyr*, 5 db *Candida famata*). Ez utóbbi faj helyett a következő, idő-ölés kísérleteinkben 3 db *Candida lusitaniae* és 3 db *Candida guilliermondii* törzset használtunk fel. A törzsek nagy része vérmintákból származott, másik részét légúti mintákból, sebekből, peritoneális és pleurális üregekből, valamint hüvelyi mintákból izolálták.

Sarjadzó gombák azonosítása

A csíratömlő képzés kimutatására a Sabouraud-agaron nőtt tenyészeteket főtális borjúszerumban inkubáltuk 2 órán át.

A fajok elkülönítésére, és a tenyészetek tisztaságának ellenőrzésére –a laboratóriumunkban hagyományos módszer szerint- CHROMagar Candida (Becton Dickinson) táptalajt alkalmaztunk. További azonosítás során a rutin diagnosztikában széleskörűen alkalmazott ID32C panelt (BioMérieux) használtuk, melynek leolvasása 48 óras inkubációs idő után történt.

Az ID32C-vel kapott eredmények megerősítésére *C. inconspicua* és *C. parapsilosis* törzsek esetében molekuláris biológiai módszereket is alkalmaztunk. Ezek a módszerek magukban foglalták a PCR-ribotipizálást, és a *SADH* gén detektálását restrikciós fragmens hosszúsági polimorfizmus (RFLP) metodikájával.

Leveshígítós módszer az érzékenység meghatározására

A mikrodilúciós módszert a CLSI M27-A2 dokumentum ajánlásának figyelembe vételével végeztük el. Minden vizsgálatot legalább kétszer hajtottunk végre.

A POS (Schering-Plough Research Institute) szubsztanciát 100 %-os DMSO (standard CLSI módszer), illetve PEG (módosított módszer) használatával oldottuk fel. A FLU (Pfizer) esetében az oldószer steril desztillált víz volt. A POS-t 0.015-8 mg/L, míg a FLU-t 0.25-64 mg/L koncentrációs határok között vizsgáltuk. Ugyanezen POS plate-eket használtuk a MFC meghatározására is. A plate-eket –20 °C-on tároltuk felhasználásukig.

Az egyes törzsek gombaszuszpenzióinak elkészítése során 24 órás Sabouraud-agaron nőtt tenyészeteket használtunk. A sűrűséget denzitométer segítségével 0.5 McFarland-ban

állapítottuk meg, melyet 0.85 %-os fiziológiás sóoldatban készítettünk el. A csíraszám beállításához (10^3 , illetve 10^4 sejt/mL) RPMI-1640 táptalajt használtunk fel a hígítások során. Minden plate-en beállítottunk antifungális szert (gombakontroll), illetve sarjadzó gombát nem tartalmazó (táptalaj kontroll) kontroll üregeket is.

A mikrodilúciós lemezek 48 órás inkubálása után az egyes lyukak tartalmát pipettával homogenizáltuk, ezt követően a leolvasás szemmel történt, a prominens gátlás kritériumai alapján. Ezek szerint a MIC érték az adott antifungális szer azon legkisebb koncentrációja, mely a gombakontrollhoz képest prominens (50 %-os) csökkenést mutat.

C. krusei izolátumokat nem vizsgáltunk FLU-ra nézve, mivel ezek primer rezisztenciával rendelkeznek az antifungális szerrel szemben.

E-teszt az érzékenység meghatározására

A teszt kivitelezéséhez a gyártó ajánlásának megfelelően, 2 % glükózzal kiegészített RPMI-1640 táptalajt használtunk fel. A 0.5 McFarland sűrűségű gombaszuszpenziókat 24 órás Sabouraud-agaron nőtt tenyészetekből 0.85 %-os fiziológiás sóoldatban állítottuk be. A plate-ek inkubálása 48 órán keresztül történt 35 °C-on, leolvasásuk 24 és 48 órára is megtörtént.

Minimális fungicid koncentráció meghatározása posakonazol iránt

Az POS MFC meghatározását a Cantón és munkatársai által meghatározott módon végeztük el. Minden vizsgálatot legalább kétszer hajtottunk végre.

Az inokulum csíraszám 10⁴ cfu/mL volt, melyet kvantitatív kioltással ellenőriztünk.

Az inkubáció 48 órán át, 35 °C-on tartott, majd a 48 órás MIC meghatározás után a mikrolemezek teljesen tiszta üregeinek tartalmát (200 µl) pipettával összeszuszpendáltuk, majd 2 db Sabouraud-agarra oltottuk ki (100-100 µl). A gombaszuszpenziót egyetlen csepp formájában pipettáztuk a táptalaj felszínére, hagytuk megszáradni, majd a kioltott sarjadzó gombasejteket steril kaccsal kihúztuk a Sabouraud-agar teljes felületén. A táptalaj plate-ek inkubálása 35 °C-on 48 órán keresztül történt.

A MFC az antifungális szer azon legkisebb koncentrációja volt, amely legalább 99.9 %-os ölü hatást (≤ 3 telep) mutatott a kezdő csíraszámhoz képest.

Idő-ölés görbék (time-kill kísérletek)

Ezeket a kísérleteket a Klepser és munkatársai által leírt módon végeztük el. Egyszerre általában két törzzsel indítottunk kísérletet, és minden vizsgálatot legalább kétszer hajtottunk végre.

A kezdő csíraszám 10^5 sejt/mL volt, a POS koncentrációk értékei a következők voltak: 0.5-16×MIC (0.015-16 mg/L). A *C. parapsilosis* törzseket 32-64×MIC koncentrációkon is teszteltük.

A csöveket folyamatos rázatás mellett 35 °C-os termosztátban inkubáltuk. A csövekből 100-100 µl-eket vettünk ki előre meghatározott időpontokban. Ezeket az időpontokat az előzetes kísérleteinkből kapott eredményeinkre alapoztuk, melyeket a *C. albicans* ATCC 14053 és *C. krusei* ATCC 6258 tesztörzsekkel végeztünk. Az időpontok tehát a következőképpen alakultak: 0, 6, 18, 24, 36 és 48 óra.

A kimért 100 µl mennyiségű mintákat tízes léptékű hígítással steril fiziológiás sóoldatban hígítottuk ki (sorozathígítás). Ezt követően 4×30 µl mintákat cseppentettünk pipettával az egyes Sabouraud-agarok felszínére. Abban az esetben, amikor azt gyanítottuk, hogy a kitenyésztett csíraszám <1000 cfu/mL lesz, akkor direkt kioltásokat alkalmaztunk, vagyis közvetlenül a csövekből oltottunk ki 4×30 µl-eket. A cseppek megszáradásáig a plate-eket szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd 48 órára 35 °C-os termosztátba helyeztük őket, ezután pedig meghatároztuk a telepszámokat az egyes plate-eken.

Az idő-ölés görbék készítésénél a computer curve-fitting software programot használtuk (GraphPad Prism 4.03 Windows verzió).

A POS-t fungicid hatásúnak tekintettük, ha a kezdő inokulumhoz képest legalább 99.9 %-kal csökkentette az életképes sejtek számát. Ha a csíraszám csökkenése ennél kisebb mértékű volt, a hatást fungisztatikusnak vettük.

Eredmények interpretálása

A különböző módszerekkel kapott MIC értékeket kettő, a leolvasásban jártas kolléga és a szerző végezte, egymástól függetlenül.

Az érzékenységi vizsgálatok során minőségi kontrollként a *C. parapsilosis* ATCC 22019, illetve a *C. krusei* ATCC 6258 törzseket használtuk fel.

A CLSI által előírt kategóriákat figyelembe véve, FLU iránt É-nek vettük azokat a törzseket, amelyeknek MIC értéke ≤ 8 mg/L, DÉ-nek, ha a MIC 16-32 mg/L, és R-nek, ha a MIC > 32 mg/L volt.

POS esetében ilyen kritériumokat még nem határoztak meg.

A különböző módszerekkel kapott MIC értékeket a standard módszerrel kapott MIC értékekhez hasonlítottuk. Átlagos egyezés számítása: a kapott MIC érték ± 1 hígítási fokban azonos eredményt adott a standard módszerrel kapott MIC értékkel.

E-teszt esetében, ha a MIC értékek a leveshígítós módszerben alkalmazott kettes léptékű hígítási fokok közé estek, akkor a kapott MIC értékeket a következő hígítási fokra emeltük, annak érdekében, hogy a két érzékenységi vizsgálatban kapott MIC eredmények összehasonlíthatóak legyenek.

Eredmények

Minőségi kontroll törzsekre kapott MIC eredmények

A *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 törzsek esetén a POS MIC értékek mindig a megadott határokon belül voltak (*C. parapsilosis* ATCC 22019: 0.06-0.25 mg/L, *C. krusei* ATCC 6258: 0.12-0.5 mg/L).

Posakonazol és flukonazol iránti érzékenység meghatározása leveshígításos módszerrel

A *C. inconspicua*-ra vonatkozó FLU MIC értékek 16-128 mg/L között változtak, azaz a DÉ, illetve a R kategóriába tartoztak az összes vizsgált izolátum esetén. A *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, és *C. famata* fajok É-ek voltak FLU iránt (ezen fajok MIC₉₀ értékei 0.12-1 mg/L közé estek). A 32 db *C. albicans* izolátum közül 2, míg a 30 db *C. glabrata* izolátum közül 3 izolátum FLU MIC értéke volt a R tartományban (MIC > 32 mg/L). Egy *C. glabrata* izolátum MIC értéke 16 mg/L volt (DÉ). A többi *C. albicans* és *C. glabrata* izolátum É-nek bizonyult.

A kísérleteink során vizsgált 8 db *Candida* törzs POS-ra vonatkozó MIC értékeinek geometriai átlaga 0.04 és 0.71 mg/L között váltakozott. A legalacsonyabb MIC értékeket a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* és *C. famata* izolátumok esetén kaptuk. A 2 FLU iránt R *C. albicans* izolátum közül csak az egyik esetén volt a POS MIC érték magas (MIC > 8 mg/L), a másik izolátum POS MIC értéke 0.12 mg/L volt. Hasonlóan, a 3 FLU iránt R *C. glabrata* izolátum közül 2 izolátum mutatott emelkedett POS MIC értéket (MIC > 8 mg/L), a harmadik izolátum POS MIC értéke 1 mg/L volt.

A FLU iránt csökkent érzékenységet mutató *C. krusei* izolátumok esetén a POS geometriai MIC érték 0.22 mg/L, míg a *C. inconspicua* izolátumok esetén 0.21 mg/L volt.

E-teszt eredményei

24 óra elteltével minden *Candida* species kielégítő növekedést mutatott, így a plate-etek 1 nap múlva is könnyen lehetett értékelni.

C. tropicalis, *C. kefyr* és *C. famata* izolátumok kivételével a 24 óra elteltével leolvasott E-teszt eredmények jó korrelációt ($\geq 86\%$) mutattak a standard leveshígításos módszer során kapott eredményekkel.

Egyetlen *C. albicans* törzs esetében (melynek a leveshígításos módszerben kapott MIC értéke > 8 mg/L) a 24 órás leolvasás E-teszt eredménye 0.03 mg/L volt, és csak 48 óra elteltével tapasztaltunk a BMD MIC értékkel azonos eredményt, vagyis MIC > 8 mg/L.

Kettő *C. glabrata* törzs a leveshígítási módszer során magasabb MIC értékeket mutatott POS-ra nézve ($\text{MIC} > 8 \text{ mg/L}$), és ezek az emelkedett MIC értékek az E-teszt során szintén megfigyelhetőek voltak a 24 órás leolvasást követően.

48 órás inkubációs idő után a geometriai-közép MIC értékek emelkedtek. Az emelkedés a legnagyobb mértékben a *C. glabrata* izolátumok esetén volt megfigyelhető, közel négyszeres geometriai-közép MIC értéket kaptunk. A standard módszerrel való egyezés ± 1 hígítási fokon belül rendkívül rossz (16.7 %) volt.

Az oldószerek hatása a MIC értékekre

Amikor DMSO helyett PEG-t használtunk oldószerként, a MIC értékekben mutatkozó eltérés elenyésző volt. *C. parapsilosis* kivételével (85.7 %), a teljes egyezés egy hígítási fokon belül 97-100 % volt. A MIC értékek *C. glabrata* és *C. kefyr* esetében általában magasabbak voltak, amikor a POS oldószereként PEG-t használtunk.

Minimális fungicid koncentráció eredményei

A MFC meghatározás során a magasabb csíraszámú inokulummal (10^4 sejt/mL) kapott MIC értékek megegyeztek, vagy egy hígítási fokkal voltak magasabbak a CLSI által leírt standard inokulumok (10^3 sejt/mL) használata során tapasztalt MIC értékekhez képest.

A POS alacsony koncentrációkon ($\leq 2 \text{ mg/L}$) is fungicid hatásúnak bizonyult minden *C. inconspicua* és *C. lusitaniae* törzzsel szemben, valamint a *C. krusei* (24/29, 83 %), *C. parapsilosis* (20/28, 71 %), illetve *C. kefyr* (9/13, 69 %) izolátumok nagy többségénél is.

Ezzel szemben *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* törzsek esetében a POS egyértelműen fungisztikus hatásúnak mutatkozott.

Idő-ölés görbék (time-kill) kísérletek eredményei

A vizsgált izolátumok és ATCC tesztörzsek MIC, illetve MFC értékeit az 1. táblázat rögzíti.

1. táblázat: Idő-ölés kísérletekben vizsgált *Candida* fajok

Vizsgált fajok (vizsgált izolátumok száma)	A vizsgált izolátumok MIC tartománya (mg/L) ¹	A vizsgált izolátumok MFC tartománya (mg/L) ¹
<i>C. albicans</i> (4)	0.03->8	>8
<i>C. glabrata</i> (3)	0.5->8	>8
<i>C. tropicalis</i> (2)	0.06-0.25	>8
<i>C. parapsilosis</i> (12)	0.06-0.12	0.5->8
<i>C. krusei</i> (9)	0.25	0.5-8
<i>C. inconspicua</i> (4)	0.12-0.25	0.5-1
<i>C. lusitaniae</i> (3)	0.06	2
<i>C. guilliermondii</i> (3)	0.25	>8
<i>C. kefyr</i> (3)	0.06	0.5-8
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	0.12	>8
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	0.5	>8
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0.12	>8
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0.25	0.5
<i>C. inconspicua</i> ATCC 16783	0.12	0.5
<i>C. guilliermondii</i> ATCC 6260	0.25	>8
<i>C. norvegensis</i> ATCC 22977	0.12	0.25

¹ A CLSI M27-A2 metodikáján alapuló MIC/MFC értékek meghatározása, azonban a kezdő csíraszám 10⁴ cfu/mL

A klinikailag jelentős *Candida* fajok közül a POS fungicid hatásúnak bizonyult a *C. krusei*, a *C. lusitaniae*, a *C. kefyr* és a *C. inconspicua* klinikai izolátumok esetén.

A *C. krusei* izolátumok közül csak az ATCC 6258-as számú törzs esetén tapasztaltunk fungicid hatást 24 óra alatt 4 mg/L (16xMIC) értéken. Bár 36 óra múlva egy klinikai izolátum esetén már az 1 mg/L koncentrációjú POS is fungicid hatásúnak bizonyult, a legjobb fungicid hatást 48 óra múlva figyelhetjük meg. A 9 klinikai izolátumból 7 esetén már az 1 mg/L (4xMIC) koncentrációjú POS is fungicidnek bizonyult; a maradék két izolátum esetén pedig 2 mg/L (8xMIC) koncentrációjú POS alkalmazásával kaptunk legalább 99.9 %-os csíraszám csökkenést a kezdő inokulumhoz képest.

A POS mindhárom *C. lusitaniae* izolátum esetén fungicid hatásúnak bizonyult már 0.25 mg/L (4xMIC) koncentráción 48 óra múlva. 1 mg/L POS koncentráción 2 izolátum már 24 óra, míg 36 óra múlva mindhárom izolátum legalább 99.9 %-os csíraszám csökkenést mutatott a kezdő inokulumhoz képest (fungicid hatás).

Két *C. kefyr* izolátum ellen a POS 24 óra múlva már 1 mg/L koncentráción (16xMIC) fungicidnek bizonyult. Ugyanezen törzsek 36 óra múlva már legalább 99.9 %-os csíraszám csökkenést mutattak a kezdő inokulumhoz képest (fungicid hatás) 0.12 mg/L (0.5-1xMIC) értékeken. A POS a harmadik *C. kefyr* izolátum ellen, korrelációban a MFC értékkel, fungisztatikus hatást mutatott.

Három *C. inconspicua* klinikai izolátum, hasonlóan az ATCC tesztörzshöz, már 24 óra múlva legalább 99.9 %-os csíraszám csökkenést mutatott a kezdő inokulumhoz képest 1 mg/L (8xMIC) POS koncentráció hatására (fungicid hatás). Ezen izolátumok ellen a POS már 0.06 mg/L (0.5xMIC) koncentráción 36 óra után fungicid hatásúnak mutatkozott. Egy izolátum ellen a POS csak 48 óra után mutatott fungicid hatást 0.25-2 mg/L (4-16xMIC) koncentrációkon.

A *C. norvegensis* ATCC 22977 tesztörzsszel szemben a POS 36 óra múlva fungicidnek bizonyult 1-16xMIC koncentrációkon.

A POS a *C. albicans*, a *C. glabrata*, a *C. tropicalis* és *C. guilliermondii* ellen, megerősítve a MFC meghatározás során kapott értékeket, fungisztatikus hatásúnak bizonyult. A POS a *C. albicans*, a *C. tropicalis* és a *C. guilliermondii* izolátumok növekedését 2-16xMIC értékeken gátolta.

A POS a *C. glabrata* izolátumok ellen csak gyenge gátló hatással rendelkezett; bármely tesztelt POS koncentráción növekedés volt tapasztalható. A legjobb gátló hatást 4-8xMIC értékeken figyelhettük meg. A magas POS MIC-val (> 8 mg/L) rendelkező *C. glabrata* és *C. albicans* izolátumok idő-ölés görbéje 16-32 mg/L POS koncentrációkon a kontrollhoz volt hasonló.

Bár a MFC értékek alapján sok *C. parapsilosis* izolátum ellen a POS fungicid hatású volt (MFC: 0.5 - > 8 mg/L), az idő-ölés görbék ezt egyetlen esetben sem igazolták. A POS már 0.5xMIC értékeken is fungisztatikus hatású volt az összes vizsgált törzs ellen, és 48 óra után minden esetben, már 1-16xMIC értékeken is csökkentette az élő gombasejtek számát a kezdő inokulumhoz képest.

Megbeszélés, következtetések

Munkámban a POS, mint legújabb triazol típusú antifungális szer hatékonyságát vizsgáltam a leggyakrabban előforduló 10 *Candida* faj több mint 200 klinikai anyagból izolált törzse esetén. A vizsgált fajok közül a *C. krusei* és a *C. inconspicua* csökkent érzékenységet mutattak a leggyakrabban használt antifungális szer, a FLU iránt.

A POS a standard leveshígítós mikrodilúciós módszer szerint, egyezve a nemzetközi adatokkal, kitűnő *in vitro* aktivitást mutatott a klinikai anyagokból izolált *Candida* fajok ellen. A legmagasabb MIC₉₀ értéket a *C. glabrata* esetén mértük, bár ezek az adatok alacsonyabbak a Pfaller és munkatársai által kapott 4 mg/L-es MIC₉₀ értéknél.

Bebizonyítottuk, hogy a FLU-ra *C. albicans* és *C. glabrata* fajok a POS iránt nem minden esetben mutattak csökkent érzékenységet. Ennek magyarázata valószínűsíthetően abban keresendő, hogy a két antifungális szer eltérő rezisztencia mechanizmussal rendelkezik. Eszerint a POS hatását kevésbé befolyásolja a lanosterol-demetiláz gén mutációja, valamint a FLU-lal ellentétben a POS nem tekintendő a főbb efflux pumpák potenciális szubsztrátjának.

Eredményeink alapján minden *C. krusei* és *C. inconspicua* törzs már alacsony POS MIC értékeken is jól gátolható. Ezek az eredmények szintén eltértek a Pfaller és munkatársai által kapott eredményektől, bár ők kísérleteikben csak 3 db *C. inconspicua* törzset teszteltek, és az egyiknél megállapított POS-ra vonatkozó MIC érték > 8 mg/L volt. A szerzők feltételezték, hogy a POS és FLU között valószínűleg keresztrezisztencia áll fenn. Az általunk kapott eredményeket elemezve azonban az általuk valószínűsített keresztrezisztencia inkább egy kivételes esetnek tekinthető, mintsem általános jelenségnek.

Eredményeink alapján a gyógyszer feloldására használt oldószer minősége (DMSO helyett PEG) elhanyagolható mértékben befolyásolta a kapott MIC értékeket, a fajra bontott MIC egyezés, a *C. parapsilosis* kivételével, 97-100 % volt a vizsgált fajok esetében. A különböző szerzők által kapott POS MIC értékek jobb összehasonlíthatósága miatt azonban tanácsosabb a standard módszerben leírt DMSO-t használni PEG helyett a makro-, és mikrodilúciós kísérletekben.

Munkánkban nagyszámú *C. inconspicua* izolátummal bővítettük az E-teszt adatbázist. Az E-teszttel 24 óra múlva leolvasott POS MIC értékek kiváló egyezést mutattak a standard módszerrel, igazolva ezzel, hogy az E-teszt kitűnő MIC meghatározási

alternatíva. A rutin laboratóriumi gyakorlat számára tehát javasolható az E-teszt használata POS esetén is.

Egyezve a triazolokra vonatkozó korábbi adatokkal, a POS fungisztatikusnak bizonyult a klinikailag jelentős *Candida* fajok közül a *C. albicans*, a *C. glabrata*, a *C. tropicalis* a *C. parapsilosis* és a *C. guilliermondii* ellen. A *C. glabrata* kivételével a fungisztatikus hatás már alacsony, a MIC értékekhez közeli POS koncentrációkon bekövetkezett. A *C. glabrata* esetén a fungisztatikus hatás nagyon gyenge volt, a vizsgált izolátumok közül semmilyen vizsgált koncentráción nem tapasztaltunk csíraszám csökkenést a kezdő inokulumhoz képest. A gyenge fungisztatikus hatásra a különböző módszerek alapján vizsgált MIC értékek közül egyedül a 48 órás E-teszt eredmények utalnak. Bár a 48 órás E-teszttel mért MIC értékek és a levesthígítós módszer eredményei között rendkívül gyenge egyezést tapasztaltunk, klinikai relevanciája nem zárható ki a 48 órás inkubációs idő után mért E-teszt értékeknek *C. glabrata* esetén.

A POS koncentráció-, és főleg időfüggő fungicid aktivitást mutatott az összes vizsgált *C. krusei*, *C. inconspicua*, *C. lusitaniae* és a két alacsony MFC értékkel rendelkező *C. kefyr* izolátum ellen. A fungicid hatás 1 mg/L POS koncentráción már 24 óra múlva megfigyelhető volt 2-2 *C. lusitaniae* és *C. kefyr* törzsek esetén, illetve 4 tesztelt *C. inconspicua* törzs (beleértve az ATCC teszt törzset is) tekintetében. Figyelemre méltó, hogy az 1 mg/L-es POS koncentráció könnyen elérhető a vérben, ezért ezeknek az eredményeknek terápiás jelentősége lehet.

A POS fungicid aktivitása 1 mg/L koncentráción a *C. krusei* törzsek többségénél, illetve egy darab *C. inconspicua* izolátum esetén csak 48 óra után volt megfigyelhető. Két *C. krusei* klinikai izolátum esetén csak 2 mg/L POS esetén észleltünk fungicid hatást. Mivel mind a *C. krusei*, mind pedig a *C. inconspicua* csökkent érzékenységet mutat a leggyakrabban használt FLU iránt, a VOR pedig csak gyenge fungicid hatást mutat e két faj ellen, a POS valódi terápiás alternatíva lehet a *C. krusei* és *C. inconspicua* fertőzések kezelésénél.

A MFC eredményeink kitűnő korrelációt mutattak az idő-ölés görbék eredményeivel (nem számítva a *C. parapsilosis* izolátumokat) az összes vizsgált faj esetén, azaz, a jóval könnyebben elvégezhető MFC vizsgálat segítségével előre meg lehet jósolni POS esetén az esetleges fungicid, vagy fungisztatikus hatást a különböző *Candida* fajok tekintetében. Bár 28 vizsgált *C. parapsilosis* izolátumnál 22 esetben a MFC érték ≤ 2 mg/L volt, az idő-ölés görbék ezt egyetlen esetben sem igazolták, annak ellenére, hogy $32-64 \times \text{MIC}$ értékeken is elvégeztük a kísérleteket. Ennek okát csak valószínűsíteni tudjuk.

Valószínűleg a POS hosszan tartó posztantifungális hatással rendelkezik a *C. parapsilosis* törzsek ellen, így lehetséges, hogy a 48 óra helyetti 72 órás inkubációs idő lehetővé tette volna a növekedésben gátolt, de élő *C. parapsilosis* sejtek detektálását Sabouraud-agaron. Ennek meghatározása a jövő feladata.

Eredményeink alapján a POS kiváló *in vitro* aktivitással rendelkezik a klinikailag jelentős sarjadzó gombák ellen mind a MIC értékek, mind pedig az idő-ölés görbék eredményei alapján. A POS fungicid hatásának bizonyult több, klinikailag jelentős sarjadzó gomba ellen, de ennek lehetséges *in vivo* terápiás hatását tovább kell vizsgálni. Bár nagyszámú, HIV-pozitív beteg szájüregi-, és nyelőcső candidiázisának a kezelése során a POS legalább olyan klinikai hatást mutatott, mint a FLU, candidémiás, neutropéniás betegek POS kezeléséről jelenleg még nincs irodalmi adat. Az ilyen vizsgálatoknak határt szabhat az a tény, hogy a POS-nak jelenleg nincs parenterális formája, és a fokozottabb felszívódást csupán magasabb zsírtartalmú ételek fogyasztásával próbálják elérni. A napi 800 mg POS kezelés során a POS egyensúlyi koncentrációja a vérben 689-817 ng/mL-nek adódott (mért szélső értékek: 0-3710 ng/mL) 194 beteg invazív candidázisa során végzett vizsgálatok alapján. Ráadásul a POS nagyobb, mint 90 %-ban kötődik fehérjékhez a szérumban, csökkentve ezzel a szabad, biológiailag aktív POS koncentrációt. Ezen tények jelenleg meghatározzák a POS alkalmazhatóságát a súlyos, invazív fertőzések kezelésében, bár profilaxisra, akár csontvelőtranszplantált betegek esetén, kiválóan alkalmasnak tűnik.

Az intravénás POS-t minél előbb ki kell fejleszteni, nehogy az itrakonazolhoz hasonlóan marginális szerepe legyen az antifungális terápiában.

Az eredmények összefoglalása

1. A POS a MIC értékek alapján kiváló *in vitro* aktivitást mutatott (oldószerből függetlenül) a klinikailag fontos *Candida* fajok ellen, beleértve a FLU iránt csökkent érzékenységet mutató fajokat is.
2. A POS MIC értékeinek jobb összehasonlíthatósága érdekében a DMSO-t javasoljuk a gyógyszer feloldására PEG helyett a makro-, és mikrodilúciós kísérletek elvégzésénél.
3. A leveshígítási módszerrel kapott MIC értékek jó korrelációt mutattak az E-teszt alkalmazásakor kapott MIC értékekkel, ezért az E-teszt érzékenység meghatározási módszer kiválóan és biztonságosan használható a rutin diagnosztikában.
4. A klinikailag legjelentősebb *Candida* fajok POS iránti MFC értékeinek meghatározása során a POS számos *Candida* faj ellen fungicid hatású volt (*C. inconspicua*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*), míg *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* izolátumok esetén fungisztatikusnak bizonyult.
5. Az idő-ölés görbék, a *C. parapsilosis* kivételével, teljes mértékben alátámasztották a MFC meghatározás által kapott eredményeket.
6. Mivel a POS-nak jelenleg csak *per os* formája áll rendelkezésre a klinikai gyakorlatban, a szer intravénás formájának a kifejlesztése jelentősen javítaná az invazív gombafertőzésekben szenvedő betegek eredményes kezelését.

Az értekezésben felhasznált közlemények

1. **Sóczó G.**, G. Kardos, P. M. McNicholas, E. Balogh, L. Gergely, I. Varga, B. Kelentey, L. Majoros. (2007). Correlation of posaconazole minimum fungicidal concentration and time-kill test against nine *Candida* species. *J. Antimicrob. Chemother.* 60:1004-1009. **IF: 4,038**. Független hivatkozás: 2.
2. **Sóczó G.**, G. Kardos, P. M. McNicholas, E. Falusi, L. Gergely, L. Majoros. (2007). Posaconazole susceptibility testing against *Candida* species: Comparison of broth microdilution and Etest methods. *Mycoses.* 50:178-182. **IF: 1,327**

Egyéb közlemények

1. Varga I., **G. Sóczó**, G. Kardos, Á. Kemény-Beke, B. Kelentey, I. Márton, L. Majoros. Differences in killing activity of caspofungin and paradoxical growth between *C. albicans* and *C. krusei* clinical isolates in different media. *Journal of Chemotherapy*. 2008. (accepted for publication). **IF: 0,922**
2. Varga I., **G. Sóczó**, G. Kardos, Á. Borbély, Z. Szabó, Á. Kemény-Beke, L. Majoros. 2008. Comparison of killing activity of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 62:1466-1468. **IF: 4,038**
3. Szabó Z., **G. Sóczó**, C. Miszti, P. Hermann, F. Rozgonyi. 2008. *In vitro* activity of fluconazole and amphotericin B against *Candida inconspicua* clinical isolates as determined by the time-kill method. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 55:53-61.
4. Varga I., **G. Sóczó**, G. Kardos, L. Majoros. 2008. Time-kill studies investigating the killing activity of caspofungin against *Candida dubliniensis*: comparing RPMI-1640 and antibiotic medium 3. *J. Antimicrob. Chemother.* 62:149-152. **IF: 4,038**
5. **Sóczó G.**, G. Kardos, I. Varga, B. Kelentey, R. Gesztelyi, L. Majoros. 2007. *In vitro* studies with *C. tropicalis* isolates exhibiting paradoxical growth in the presence of high concentrations of caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3486-3488. **IF: 4,390**. Független hivatkozás: 1.

Totál IF: 18,753