

EGYETEMI DOKTORI (Ph. D.) ÉRTEKEZÉS

Sóczó Ágnes Georgina

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

Témavezető: Dr. Majoros László

**DEBRECENI EGYETEM ORVOS-ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ORVOSI MIKROBIOLÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN**

2008

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK	2
FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK.....	3
1. BEVEZETÉS.....	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. <i>CANDIDA</i> FAJOK ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE, PATOGENEZISE.....	6
2.2. <i>CANDIDA</i> FAJOK ÁLTAL OKOZOTT MEGBETEGEDÉSEK	8
2.3. SARJADZÓ GOMBÁK AZONOSÍTÁSA A RUTIN DIAGNOSZTIKAI MUNKÁBAN.....	8
2.4. A SARJADZÓ GOMBÁK EPIDEMIOLÓGIÁJA	9
2.5. ANTIFUNGÁLIS SZEREK JELLEMZÉSE	10
2.5.1. <i>Polién típusú antifungális szerek</i>	10
2.5.2. <i>5-Fluorocitozin (5-FC)</i>	11
2.5.3. <i>Echinocandinok</i>	11
2.5.4. <i>Azól típusú antifungális szerek</i>	12
2.5.4.1. Flukonazol (2,4-difluoro- α , α - 1 - bisz(1H-1,2,4-triazol- 1 - ilmetil)benzil-alkohol)	12
2.5.4.2. Vorikonazol	13
2.5.4.3. Itrakonazol	14
2.5.4.4. Posakonazol (SCH-56592)	14
2.5.4.5. Ravukonazol, albakonazol.....	15
2.5.5. <i>In vitro érzékenységi vizsgálatok</i>	16
2.5.5.1. Standard mikrodilúciós módszer.....	16
2.5.5.2. E-teszt.....	17
2.5.5.3. Minimális fungicid koncentráció meghatározása.....	17
2.5.5.4. Time-kill kísérletek (idő-ölés görbék)	18
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	20
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	21
4.1. SARJADZÓ GOMBÁK EREDETE	21
4.2. SARJADZÓ GOMBÁK AZONOSÍTÁSA	21
4.3. LEVESHÍGÍTÁSOS MÓDSZER AZ ÉRZÉKENYSÉG MEGHATÁROZÁSÁRA.....	21
4.4. E-TEST AZ ÉRZÉKENYSÉG MEGHATÁROZÁSÁRA	22
4.5. MINIMÁLIS FUNGICID KONCENTRÁCIÓ MEGHATÁROZÁSA POSAKONAZOL IRÁNT	22
4.6. IDŐ-ÖLÉS GÖRBÉK (TIME-KILL KÍSÉRLETEK)	23
4.7. EREDMÉNYEK INTERPRETÁLÁSA	24
5. EREDMÉNYEK.....	25
5.1. MINŐSÉGI KONTROLL TÖRZSEKRE KAPOTT MIC EREDMÉNYEK	25
5.2. POSAKONAZOL IRÁNTI ÉRZÉKENYSÉG MEGHATÁROZÁSA LEVESHÍGÍTÁSOS MÓDSZERREL	25
5.3. E-TEST EREDMÉNYEI	25
5.4. AZ OLDÓSZEREK HATÁSA A MIC ÉRTÉKEKRE	28
5.5. MINIMÁLIS FUNGICID KONCENTRÁCIÓ EREDMÉNYEI	29
5.6. IDŐ-ÖLÉS GÖRBÉK (TIME-KILL) KÍSÉRLETEK EREDMÉNYEI.....	31
6. MEGBESZÉLÉS, KÖVETKEZTETÉSEK	41
7.EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	46
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	47
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	48
10.AZ ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK	60
11. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK.....	60
12. FONTOSABB POSZTEREK.....	61

Fontosabb rövidítések

AMB: amphotericin B

ATCC: American Type Culture Collection

BMD: broth microdilution method

CAS: caspofungin

cfu: colony forming unit

DÉ: dózisfüggően érzékeny

DMSO: dimetil-szulfoxid

É: érzékeny

FLU: flukonazol

5-FC: 5-fluorocitozin

MIC: minimális gátlási koncentráció

MFC: minimális fungicid koncentráció

PEG: polietilén-glikol

POS: posakonazol

R: rezisztens

VOR: vorikonazol

1. 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 (23, 43, 70, 78, 84).

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 egyidőben a többi, nem-*C. albicans* *Candida* fajok által okozott megbetegedések száma is megnövekedett (43, 72, 80).

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 (79, 90). A súlyos sebészeti beavatkozásokon átesett betegek, valamint 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 megjelenését is, mint felelős tényezőt (pl. HIV-fertőzöttek) (21, 23, 32, 38, 43, 48, 66, 67, 71, 84).

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 (21, 96).

Ezek az antifungális szerek, különösen az újabb triazolok, 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 (12, 27, 28, 35, 44, 55, 56, 61, 88, 95).

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 levesthígítási módszer és E-teszt), valamint megvizsgáltam a POS *in vitro* érvényesülő ölü hatását a minimális fungicid koncentráció (MFC) meghatározása és az idő-ölés görbe (time-kill curve) (45) segítségével, mellyel kapcsolatosan tudomásom szerint még egyetlen szerző sem közölt adatokat.

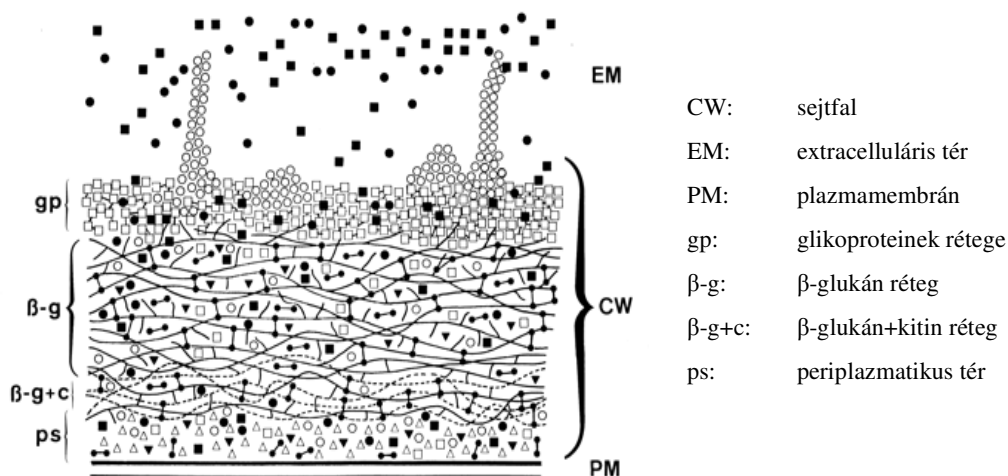
2. Irodalmi áttekintés

2.1. *Candida* fajok általános jellemzése, patogenezise

A sarjadzó gombákat az eukarióták közé sorolják. Két fő megjelenési formájuk van: az egysejtű és a fonalas alak (hifa).

A *Candidák* 2–3 x 4–6 μm nagyságú ovális sejtek, képesek ezen kívül pszeudohifák képzésére is, amelyek a szeptumoknál elágazódhatnak. Ritkán valódi hifákat is megfigyelhetünk (87). Egyes *Candida* fajok csíratömlőt és klamidospórát is képeznek (83, 105). A *Candida* speciesek vastag sejtfallal rendelkeznek, amely alkotó a sejtek alakjáért és a stabilitás kialakításáért felelős, ezen kívül a fagocita sejtek elleni védelemben is jelentős szerepet kap. Sejtfaluk fő alkotóeleme a β -glukán váz, amelyet, főképp a sejtfal alsóbb rétegeiben kis mennyiségű kitin szilárdít (1. ábra). Emellett mannánt és mannitot tartalmazó glikoproteineket is nagy mennyiségben tartalmaz, a mannopeptidek a patogenezisben és az antifungális immunválaszban egyaránt szerepet játszanak (57, 116).

1. ábra: A *Candida* sejtfallszerkezete



A sejtfa felépítő és lebontó folyamatok az antifungális szerek lehetséges támadási pontjai, csakúgy, mint a sejtmembránban megtalálható gombákra jellemző ergosterol (57, 116).

A *Candida* speciesek a humán normál flóra tagjaként megtalálhatóak a bőrön, a szájüregben, a hüvelyben, és a vastagbélben is (9, 66), azonban különböző körülmények (mint

az immunszupprimált állapot) esetén patogénekké válhatnak. Ebben a folyamatban a jól szabályozott virulenciafaktoroknak van szerepük (20, 40, 41, 42).

A sarjadzó gombasejtek tapadását a sejtfelszíni hidrofobicitás, illetve a felületen lévő komplementkötő receptorok, fibronektinek, integrinek biztosítják (9, 106). Koaggregációs folyamatok során a sarjadzó gombák szervezetben való megtelepedését a különböző aerob-, és anaerob baktériumok is elősegíthetik. Ezek közül főleg a *Fusobacterium nucleatum* és a *Streptococcus gordonii* szerepét kell kiemelnünk (39).

Az egyes *Candida* fajok biofilm képzésére képesek, mely az antifungális szerek számára átjárhatatlan, illetve fertőzés gócaiként is szerepelhet (9, 13, 21).

A gazdaszervezethez való adaptációban van szerepe a fenotípusváltásnak, amely során a fehér teleptípus-opálos teleptípus átalakulás következik be. Felmerült az a feltételezés, hogy ennek a jelenségnek is szerepe lehet a patogenezis kialakításában (9, 87).

Fontos virulencia tényező a sarjadzó sejt-hifa átalakulás (9, 99, 101). Az immunrendszer hatásosabban védekezik a hifát nem képező mutánsok ellen, tehát az ezek által okozott letalitás állatmodellekben kisebb (87). Ebben az esetben a fukóz és a mannóz receptorok közvetítésével valósul meg az immunválasz, a gyulladásos citokinek szintje nő, beindulnak az ölési folyamatok (87, 101). Ezzel ellentétben a hifát képező mutánsok virulensebbek, amely azzal magyarázható, hogy a hifák ölése sokkal lassabban következik be. A hifa fagocitózisa a CR3 és Fc receptorok segítségével történik, ezt megsokszorozódott IL-4 és IL-10 termelés követi (9). Így a Th-2-es immunválasz fog dominálni, mely ugyan növeli az ellenanyagszintet, de csökkenti a fagocitózist (101).

A különböző szekretált enzimek, mint az aszpartil-proteáz, foszfolipáz és lipáz szintén fontos virulenciafaktorok. A legalább tíz különböző *sap* gén által kódolt szekretált aszpartil-proteáz főleg a nyálkahártya és a belső szervek invazív fertőzéséért felelős (19, 41, 93, 94). A nyálkahártya fertőzésekben főleg a *sap*1-3, míg az invazív fertőzésekben a *sap* 4-6 gének termékeinek szerepe jelentős (20, 21, 94). *C. albicans*-sal intravénásan fertőzött egerek esetében a foszfolipáz enzim jelenléte szintén növelte a letalitást (42, 87, 99). Lehetséges virulenciafaktorként emlegetnek még egy harmadik enzimet, az észterkötéseket bontó lipázt. Ezek az enzimek a gombát tápanyaghoz juttatják glicerín-P és szabad zsírsavak felszabadításával (40).

2.2. *Candida* fajok által okozott megbetegedések

A *Candida* speciesek által okozott megbetegedések lehetnek enyhe, kellemetlen tünetekkel járó, illetve súlyos, életet veszélyeztető fertőzések (38, 66, 67, 71). Az első csoportba tartoznak a nyálkahártya fertőzései, míg a második csoport az invazív fertőzéseket foglalja magában (38, 66, 67, 71).

Csökkent immunvédekezésű (pl. HIV-fertőzött betegek) majdnem 90 %-a szenved oropharyngeális candidiázisban (91).

Az orális candidiázisnak számos klinikai megjelenési formája ismert. Egészségesekben elsősorban a pszeudomembránózus forma fordul elő, míg immunszupprimált betegekben inkább az eritémás és a hiperplastikus formák alakulnak ki (91).

Az infekció során a szájüreg nyálkahártyája fertőződik meg, vagyis ennek épsége döntő szerepet játszik a betegség elleni védelemben. A nyálkahártya hámrétege mechanikai barriert képez, a rajta élő mikróbaközösség pedig a kolonizációs rezisztencia útján védi a nyálkahártyát (91).

Az invazív gombafertőzések nagy része bőr-, illetve gasztrointesztinális eredetű (66). A bőrön kolonizált *Candida* fajok főleg intravaszkuláris katéterekkel rendelkező betegek esetén kerülhetnek be a véráramba. Különösen fontos ez a fertőzési forma az újszülöttek *Candida parapsilosis* okozta candidémiás fertőzései esetén (67, 70). Gasztrointesztinális eredetű candidémia esetén a sebészeti műtétek, illetve a daganatos kemoterápia miatt károsodott nyálkahártya sérülés jelenti a fő rizikófaktorokat (66, 71).

Amikor az 1990-es évek elején a FLU-t bevezették a klinikai gyakorlatba, a *C. albicans* okozta candidémiák száma csökkent, ezzel párhuzamosan azonban növekedett a nem-*C. albicans Candida* fajok által előidézett esetek száma. Ennek folyamán főleg a *C. glabrata*, és a *C. krusei* által okozott candidémiás esetek szaporodtak meg (32, 47, 48, 69, 75, 90).

2.3. Sarjadzó gombák azonosítása a rutin diagnosztikai munkában

A rutin diagnosztikában a sarjadzó gombák faj szerinti azonosítása során az általános gyakorlat, hogy a mintákat először kloramfenikolt tartalmazó Sabouraud-agaron növesztjük. A kinőtt telepek azonosítása a továbbiakban kétféleképpen történhet a rutin laboratóriumi diagnosztikában:

1. Csíratömlő képzés detektálására a Sabouraud-agaron nőtt tenyészeteket főtális borjúszerűmban inkubáljuk 1-2 órán keresztül. Ez a jelenség tipikus *C. albicans* és *Candida dubliniensis* esetében (7, 107, 114).

2. CHROMagar-Candida táptalajra oltjuk át további azonosítás céljából. Ezen a gyárilag elkészített táptalajon az egyes gombafajok különböző színű telepeket képeznek 37 °C-on 24-48 órás inkubációs idő után. A táptalajban lévő kromogén szubsztrátokat a fajok különböző színnel inkorporálják. A *C. albicans* kékeszöld színű telepeket, a *C. krusei* rózsaszín, a *C. glabrata* ciklámen, míg a *Candida tropicalis* szürkés-kék telepeket képez.

Mivel a CHROMagar-Candida csupán előzetes (preszumptív) azonosításra szolgál, ezért a további azonosítás miatt általában szénhidrát asszimiláción alapuló gyári kit-eket használunk (31, 68, 107). Európában a leggyakoribb az ID 32C panel, de több más módszer is használatos (API20C, MICRONAUT-Candida, stb.) (108).

Némely esetben a faj további pontos meghatározására molekuláris biológiai-, és szerológiai módszereket is szükséges lehet alkalmazni (49, 50, 57). Ilyen *Candida* fajok a *Candida famata*, *Candida inconspicua*.

2.4. A sarjadzó gombák epidemiológiája

A rutin diagnosztikában leggyakrabban izolálható faj a *C. albicans*. Ez a species hosszú ideje tartja magát, mint az invazív és nem invazív gombafertőzések első számú kórokozója. Második helyen általában a *C. glabrata* áll (79), bár Dél-Amerika egyes országaiban a *C. parapsilosis* a második leggyakoribb *Candida* faj a candidémiákból kitenyészett sarjadzó gombák között (79). A sorban általában a harmadik-negyedik leggyakoribb kórokozó a *C. tropicalis* szokott lenni, amely főleg daganatos megbetegedésben szenvedő betegekből izolálható (79). A *C. krusei* csupán 1-3 %-ban fordul elő a véráramból kitenyészett sarjadzó gombák között, de hematológiai osztályokon akár a 30 %-ot is elérheti az előfordulási gyakorisága (69, 70, 78, 90).

Mint említettem, a *C. albicans* még mindig a leggyakrabban izolálható faj, de a nem-*C. albicans Candida* fertőzések több országban, összességében már nagyobb, mint 50 %-ban felelnek az invazív fertőzésekért (23, 38, 43, 70, 71, 72, 78, 80, 84). A hosszan tartó antifungális kezelésnek és a betegek még súlyosabb mértékű immunkárosodásának valószínű szerepe van ebben.

2.5. Antifungális szerek jellemzése

Bár az utóbbi időben nőtt az elérhető antifungális szerek száma, a mortalitás aránya még így is elérheti a 40-80 %-ot (gombafajtól függően) invazív gombás fertőzések esetén (23, 43, 70, 78, 84). Bár a prognózist illetően a neutropénia megléte, illetve az alapbetegség a legfontosabb, az azonnali és helyesen megválasztott antifungális terápia javítja a túlélési rátát (71).

Az alábbiakban az elérhető, szisztémás kezelésre alkalmazható fontosabb antifungális szereket szeretném röviden ismertetni, alaposabban kitérve az újabb triazol típusú antifungális szerekre, ezen belül a POS-ra, VOR-ra, és a FLU-ra.

2.5.1. Polién típusú antifungális szerek

Az ide tartozó antimikotikum a fungicid hatásúnak tekintett amphotericin B (AMB), amely a sejtmembrán irreverzibilis károsítása folyamán fejt ki hatását (36). Forgalomban lévő AMB formák a következők: hagyományos AMB (AMB dezoxikolát), lipid-asszociált AMB (AmBisome, Abelcet, Amphocil/Amphotec) (24, 59).

Az AMB-t fungicid hatású szernek tekintik, de az évek során kiderült, hogy ez nem minden gombafaj esetében igaz (10, 11, 71). *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *Candida lusitanae* esetén (11) az ölü hatás gyorsan bekövetkezik már 2 mg/L koncentráción is, míg más fajoknál, pl. *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* esetén a hasonló koncentráción történő fungicid hatás csak 48 óra elteltével, vagy még később következik be (11).

Az antimikotikum toxikus mellékhatásai között szerepel a hidegrázás, láz, vesekárosodás. Ezek a súlyos mellékhatások ösztönözték a kutatókat a lipid-asszociált AMB készítmények alkalmazására (24, 71).

A lipid-asszociált AMB három típusának az alkalmazása jelentősen csökkentette a súlyosabb mellékhatásokat. A lipid-asszociált AMB származékokból napi 5 mg/kg is nyugodtan adható, bár a vérben mérhető szabad, azaz fehérjéhez nem kötött AMB szintje így sem több mint 1 mg/L (51). Ennek oka az AMB nagymértékű kötődésében rejlik a plazmafehérjékhez (51).

A szabad, nem kötött AMB szintje tehát a dózis növelésével nem fokozható. Ezzel magyarázható az is, hogy a magas minimális gátlási koncentrációval (MIC) rendelkező gombafajok ellen a lipid-asszociált készítmények is hatástalanok (11). Jó példa erre a magas

MIC₉₀ (4-8 mg/L) értékkel rendelkező *C. krusei* törzsek (77), amelyek esetén még a lipid-asszociált AMB is klinikailag hatástalannak bizonyult (54).

2.5.2. 5-Fluorocitozin (5-FC)

A nukleinsav szintézist gátló antifungális szerek közé tartozik, penészgombák ellen hatástalan.

Mivel monoterápiás szerként adagolva gyorsan fejlődik ki szekunder rezisztencia a szerrel szemben, ezért általában valamilyen más antifungális szerrel kombinálva adagolják (113).

A szer ölü hatása faj-, és törzsfüggő. Ezt alátámasztja az a tény, hogy Pfaller és munkatársai fungisztatikus hatásúnak vélték *Candida* speciesek esetén (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*) (51), azonban más tanulmányokban az 5-FC fungicid hatását írták le *C. lusitaniae* (27), és *C. inconspicua* törzsek ellen (53).

Jelenleg, ritka kivételektől eltekintve, nem sarokköve az antifungális terápiának (71).

2.5.3. Echinocandinok

Az ide tartozó antifungális szerek – úgy mint caspofungin (CAS), micafungin, anidulafungin - az antimikotikumok viszonylagosan új csoportját képezik. Jelenleg mindhárom antifungális szer elérhető már invazív candidiázis és egyéb, terápiára nem reagáló aspergillózis kezelésére (47, 71).

Ezek a gyógyszerek a β -1,3-glukán-szintetáz enzim gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat, így a sejtfal szintézise csökken (21, 104).

Gyors hatású, fungicid szernek tartják őket, *Candida* speciesek esetén főleg *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* és *Candida kefyr* fajokkal szemben (22, 25, 26), viszont *C. parapsilosis*, *Candida guilliermondii* ellen csak gyenge fungisztatikus hatásúnak bizonyult (22). *Aspergillus*-ok ellen csak fungisztatikus hatást mutatnak, *Cryptococcus neoformans*-szal szemben hatástalanok (115).

Az utóbbi időkben az echinocandinokkal való eredményes kezelést esetlegesen hátrányosan befolyásoló irodalmi adatok jelentek meg (34, 102, 103). Ennek lényege az, hogy az echinocandinok nagyobb dózisban serkentik a *Candida* és *Aspergillus* fajok növekedését (paradox növekedés, Eagle-effekt) (34, 81, 103). A jelenség *in vitro* és *in vivo* egyaránt kimutatható (34, 81, 103). Pontos szerepe nem teljesen ismert a klinikumban, egyesek szerint csupán az echinocandinok leveshígítós MIC meghatározásával kapcsolatos *in vitro* jelenség.

Mindenesetre elfogadott módszer jelenleg nincs az echinocandinok pontos MIC meghatározására, bár a CLSI által ajánlott paramétereket szokták a legtöbbször használni a leveshígítós módszerek esetén (34, 58, 70, 81, 103).

Az echinocandinok javára írható, hogy keresztrezisztencia nem figyelhető meg más antifungális szerekkel szemben (47), illetve klinikai izolátumok esetén is csak hosszabb ideig tartó kezelés után figyelték meg rezisztencia kifejlődését (47).

2.5.4. Azol típusú antifungális szerek

Az azol típusú antifungális szerek kifejlesztése az 1960-as évek végére tehető. Az azolok két nagy csoportja az imidazolok (ketokonazol, mikonazol, klotrimazol), illetve a triazolok (FLU, itraconazol-ITR) (14, 36, 96). Az újabb típusú triazolok közé tartozik a POS, VOR, ravukonazol, albakonazol.

Az azolokról általánosan elmondható, hogy hatásukat a sejtmembránban levő ergoszterol szintézisének gátlásán keresztül fejtik ki (36, 96). A célenzim gyakorlatilag a citokróm P-450-dependens lanoszterol-14- α -demetiláz (CYP51), amelynek gátlása során az ergoszterol szintézise csökken és a toxikus hatású 14- α -metilált szterolok felhalmozódása következik be (36, 96).

Manapság a triazolok vették át az imidazolok helyét a szisztémás gombafertőzések terápiájában, ezért a továbbiakban csak ezen gyógyszercsoport tagjait ismertetem.

2.5.4.1. Flukonazol (2,4-difluoro- α , α -1-bisz(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)benzil-alkohol)

Elsősorban a *Candida* fajok, illetve a *C. neoformans* által okozott gombás fertőzések kezelésére alkalmazzák lokális és szisztémás kezelések formájában (71, 96). Penészgombák ellen hatástalan (47, 116).

A gyógyszer nemcsak terápiás szerként adható, de profilaxisban is széleskörűen használják (71), valójában ez a leggyakrabban alkalmazott azol típusú szer.

A *Candida* fajok többségének a MIC₉₀ értéke alacsony a FLU iránt (27, 58, 73, 98). A FLU széleskörű használatának következményeként csökkent a *C. albicans* és a *C. tropicalis* által okozott invazív fertőzéseknek a száma (43, 72, 80), de a FLU-ra primeren rezisztens *C. krusei* izolátumok számának a növekedése is megfigyelhető, főleg hematológiai osztályok esetén (69, 71). Hasonlóan növekedett a másodlagos rezisztenciával rendelkező *C. glabrata* által okozott fertőzések száma is (23, 78).

Bár a FLU-t tisztán fungisztatikus hatású szernek tartják, több esetben vetődött fel *in vitro* és *in vivo* is, hogy fajtól függően a hatás lehet fungicid is.

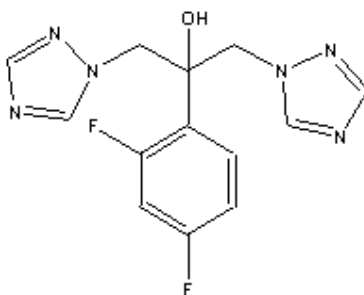
Mikamo és munkatársai *in vitro* kísérletükben (58) *C. parapsilosis* esetén azt találták, hogy a FLU már alacsony (0.125-4 mg/L) koncentrációkon is fungicid hatást fejtett ki a törzsek ellen.

Sohnle és munkatársai (98) kettő, nem replikálódó, *C. albicans* törzset (RPMI-1640 táptalaj helyett desztillált vizet használtak) vizsgáltak FLU jelenlétében, és azt figyelték meg, hogy az izolátumok életképes sejtjeinek száma csökkent FLU hatására. A kísérletet 28 napon át végezték, és fungicid hatást a 14. napon detektáltak. Ebből azt a következtetést vonták le, hogy a szer lassan ható fungicid hatású szer, melyet krónikus disszeminált candidiázisban szenvedő betegek esetében jól lehet alkalmazni.

A FLU *in vivo* fungicid hatásának bizonyult *C. neoformans*-szal fertőzött meningitiszben szenvedő nyulak esetében (73). A kísérlet végén a liquorban nem maradt életképes *C. neoformans* sejt (73).

Moosa és munkatársai (60) speciális vaginális mikrokörnyezetet megteremtve bizonyították, hogy az ecetsav a FLU-lal együtt szinergista hatást mutat, és csökkenti az életképes *C. albicans* gombasejtek számát.

Mindezen kísérletek világosan mutatják, hogy a FLU hosszabb inkubációs idő elteltével fungicid hatást is kifejthet a különböző *Candida* fajok ellen (2. ábra).



2. ábra: A flukonazol kémiai szerkezete

2.5.4.2. Vorikonazol

A VOR, amely szerkezetileg a FLU származéka, számos sarjadzó-, és penészgomba ellen hatásos, szélesspektrumú gyógyszer. A *Candida* fajok nagy többsége már alacsony koncentrációkon is érzékenynek mutatkozik a szer ellen (érzékenységi határérték ≤ 1 mg/L)

(82). Ez alól csak a *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, és *C. famata*, valamint *C. neoformans*, *Trichosporon* és *Rhodotorula* fajok képeznek kivételt (17, 89, 111).

Az *Aspergillus* speciesek nagy többségével szemben (kivétel az *Aspergillus nidulans*) is kitűnő hatással bír ($MIC_{90} \leq 2$ mg/L) (17, 89).

Rubio és Morace (61, 88) kísérleteikben, 10^3 cfu/mL kezdő csíraszámot alkalmazva megállapították, hogy a $VOR \leq 1$ mg/L koncentrációkon fungicid hatású a *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. albicans*, *C. tropicalis* és a *C. famata* törzsek ellen. Az idő-ölés görbék ezeket az eredményeket, ha nem is teljes mértékben, de a *C. lusitaniae* esetén megerősítették (27).

In vivo kísérletek alkalmával *A. fumigatus* és *Scedosporium apiospermum* által fertőzött neutropéniás nyulakban bebizonyították, hogy a VOR meghosszabbítja a túlélést, és csökkenti a szervekben található gombás tályogok számát is (12, 35).

Egy másik tanulmányban azt találták, hogy invazív aspergillózis és trichosporonosis kezelésére már 10 mg/kg dózisok elegendőek voltak a fungicid hatás eléréséhez immunszuppresszált tengerimalacokban (44, 95).

Összefoglalva a fent leírt adatokat, a VOR fungicid hatású az *Aspergillus* fajok nagy többségénél, míg a *Candida* fajoknál, és a *C. neoformans* esetében fungisztikus hatásúnak bizonyul.

2.5.4.3. Itrakonazol

A klinikai gyakorlatban ennek a gyógyszernek széleskörű használata nem igazán terjedt el. Ennek valószínű oka az, hogy a gyógyszer terápiás gyakorlatba való bevezetése idején csak a *per os* forma állt rendelkezésre. Mivel az összehasonlító klinikai vizsgálatokban (főleg az AMB-vel való összehasonlításnál) nem szívesen használtak olyan gyógyszert, amelynek nincs intravénásan is adható formája, ezért az ITR alkalmazására, tapasztalatok hiányában, invazív gombafertőzések esetén kevés ajánlást találunk (71). Fajfüggő fungicid hatását írták le *Candida* és *Aspergillus* fajoknál, bár a MFC kísérletekben alkalmazott kezdő csíraszám csak 10^3 cfu/mL volt (29, 58).

2.5.4.4. Posakonazol (SCH-56592)

A POS a legújabb gyógyszerpiacon megjelent antifungális szer, melynek hatásspektruma a VOR-hoz hasonló, de aktív egyben a *Mucor*, a *Penicillium* és a

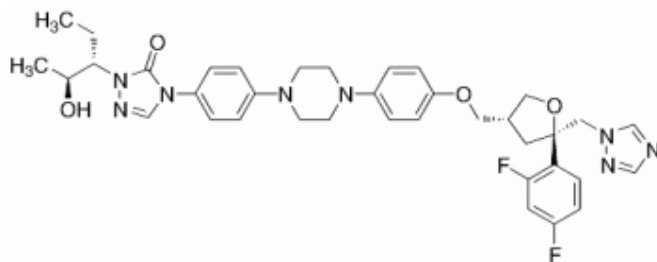
Paecilomyces fajok ellen is (17, 89). A POS-t invazív aspergillózisban szenvedő betegek kezelésére hagyták jóvá (6, 96). Hátránya, hogy csak *per os* formája van forgalomban.

Espinel-Ingroff és munkatársai meghatározták a klinikai anyagokból leggyakrabban izolálható *Candida* fajok POS iránti MFC értékeit (28). A MFC értékek nagyon közel voltak a MIC értékekhez *C. krusei*, *C. lusitaniae* és *C. neoformans* esetében. Idő-ölés görbékkel nem bizonyították azonban a fungicid hatást.

Penészgombák esetén szintén alacsony MFC értékeket mértek *A. flavus*, *A. terreus*, *Bipolaris* fajok esetén, bár idő-ölés görbékkel szintén nem erősítették meg az eredményeket (27). Fontos viszont, hogy *A. fumigatus* esetén a MFC eredményeket az idő-ölés görbék igazolták (56).

Neutropéniás egérmódelben a POS hatékony volt FLU-ra érzékeny (É), dózisfüggő érzékenységet (DÉ) mutató, valamint rezisztens (R) *C. albicans* törzsek ellen, bár a belső szervek csíramentesítését nem érték el a szerzők (fungisztatikus hatás) (8).

A gyógyszer kitűnő *in vitro* és *in vivo* hatékonyságának egyik valószínű oka a hosszú alkil oldalláncában rejlik (62, 118) (3. ábra). Ráadásul keresztrezisztencia is ritkábban fordul elő a többi triazolal (62, 118).



3. ábra: A posakonazol (SCH-56592) kémiai szerkezete

2.5.4.5. Ravukonazol, albakonazol

Klinikai gyakorlatban egyáltalán nem használatosak, valamint a gyógyszerek fejlesztése, tanulmányozása is szünetel.

2.5.5. In vitro érzékenységi vizsgálatok

Rutin érzékenységi vizsgálatokat nem minden gomba izolátum esetében kell elvégezni, alkalmazásuk főleg terápiára nem reagáló, invazív és nem invazív fertőzések esetén ajánlott (47, 71, 86).

2.5.5.1. Standard mikrodilúciós módszer

A módszernek két formája áll rendelkezésre, a mikrodilúciós-, és a makrodilúciós (leveshígításos) forma.

Az 1997-ben készült NCCLS által leírt M-27A dokumentum tartalmazza a sarjadzó gombák *in vitro* érzékenységének vizsgálatára irányuló standard körülményeket (64, 85). Ezek szerint standard tápfolyadéknak az RPMI-1640-et fogadták el, a kezdő csíraszámot pedig 10^3 sejt/mL-ben határozták meg. Az inkubálás 35 °C-on történik és a MIC értékeket 24 vagy 48 órás inkubálás után kell meghatározni.

2002-ben elkészült a módszer módosított változata (65), amely már tartalmazta a minőségi kontroll törzsek elvárható MIC értékeit is a házi készítésű panelek esetén (*C. krusei* ATCC 6258 és *C. parapsilosis* ATCC 22019). Ezen kívül ez a dokumentum alternatív lehetőségeket is ajánl a pontosabb érzékenységi eredmények produkálása érdekében (rövidebb inkubációs idő, nagyobb kezdő csíraszám, stb.) (65).

A leírat csak a FLU, ITR és az 5-FC esetében tartalmaz ajánlásokat a MIC értékeken alapuló érzékenységi kategóriákat illetően.

A gyógyszer feloldására vagy desztillált vizet (CAS és FLU), vagy a többi antifungális szer esetén dimetil-szulfoxidot (DMSO) kell alkalmazni. Egyes szerzők DMSO helyett polietilén-glikolt (PEG) szoktak alkalmazni a MIC meghatározás során, ami az eredmények korrekt összevetését hátráltathatja (70, 74, 76, 80, 82). Ostrosky-Zeichner és munkatársai 344, különböző fajba tartozó, hemokultúrából izolált *Candida* faj MIC értékét határozta meg a triazolok ellen DMSO-t és PEG-t is alkalmazva a gyógyszerek feloldására (70). Eredményeik azt mutatták, hogy PEG alkalmazása esetén a MIC értékek 2 hígítási fokkal alacsonyabbak lettek a vizsgált törzsek 30 %-a esetén. Fajra lebontva a MIC érték változását azonban nem adták meg a szerzők (70).

Hasonlóan befolyásolhatja a kapott MIC értékeket a teszt közeg is (5, 112). Az összegyűjtött irodalmi adatok alapján az „antibiotikum medium 3” (AM3) táptalaj alkalmazásával sok esetben jobb növekedést és határozottabb végpontokat kaptak, mint

RPMI-1640 esetén. Különösen az echinocandinok esetén csökken a MIC érték és az ölü hatás is gyorsabb (5, 34, 112).

Végezetül a módszer előnye, hogy pontos, jól reprodukálható adatokat kínál, hátránya azonban a munkaigényesség, és a viszonylag hosszúnak tekinthető inkubációs idő. Mindezek miatt nehezen lehet alkalmazni a rutin diagnosztikában.

2.5.5.2. E-teszt

A fentebb említett okok miatt a gyártók elkezdtek olyan különböző, *in vitro* érzékenységi vizsgálatokra alkalmas panelek gyártását, amelyekkel lényegesen lecsökken a rászánt munkaidő, és a leolvasás folyamata is egyszerűbb.

A legnépszerűbb és legelterjedtebb módszer az E-teszt, hiszen a standard módszerrel összehasonlítva ez adja a legpontosabb eredményeket, tehát a klinikai gyakorlatban is jól bevált, megbízható módszer. Ezt a metodikát széles körben alkalmazzák mind a bakteriológiai-, mind pedig a mikológiai rutin vizsgálatokban. Az E-teszt csík előre meghatározott koncentráció grádiens formájában tartalmazza az adott antifungális szert. A kérdéses izolátumot leoltják a megfelelő táptalajra, majd ráteszik a csíkot. Inkubálást követően a csík körül egy ellipszis alakú gátlási zóna keletkezik. A leolvasás nagyon egyszerű, ahol az ellipszis metszi a csíkot, ott van a MIC érték. A leolvasás 24 (azolek és triazolek, echinocandinok és 5-FC) vagy 48 órás (AMB) inkubációs idő után szokott megtörténni (36, 47, 65, 81, 86, 96, 116).

2.5.5.3. Minimális fungicid koncentráció meghatározása

A MIC értéken kívül a MFC értékének meghatározása főleg kritikus állapotú betegeknél lehet indokolt. Baktericid hatású szer alkalmazásának előnye baktériumok ellen jól ismert kritikus állapotú betegek esetén (szepszis, meningitisz) (81). Bár gombák esetén ez még nem igazolt, a gyógyszer fungicid hatásának ismerete rendkívül fontos lehet a jobb terápia eléréséhez.

Fungicid hatást a MFC érték meghatározásának útján, vagy az idő-ölés görbék segítségével lehet mérni (81).

Standard módszer, ellentétben a baktériumokkal, jelenleg nem áll rendelkezésre a sarjadzó-, és fonalas gombák MFC értékeinek meghatározására. Ennek oka abban keresendő, hogy a MFC érték meghatározását általában a MIC érték meghatározásával kötik össze (kezdő csíraszám tehát 10^3 cfu/mL), azaz a MIC értékek leolvasása után a kutatók különböző

menyiségű inokulumokat (1-100 µl) oltottak ki, így természetesen különböző arányú ölü hatást mértek. Ami közös ezekben a korábbi MFC meghatározásokban, hogy ezeknek egyike sem képes a ≥ 99.9 %-os ölü hatást mérni, ami a fungicid hatás kritériuma lenne (10, 81).

Cantón és munkatársai (10) a probléma kiküszöbölésére bevezették a nagyobb kezdő csíraszámú (10^4 cfu/mL) inokulum használatát, így lehetővé vált a legalább 99.9 %-os ölü hatás mérése (amely a MFC érték kritériuma). Ennek lényege tehát az, hogy a MIC meghatározás után, a microplate növekedést nem mutató üregeinek a teljes tartalmát (200 µl) 2 db Sabouraud-agarra cseppentjük (100-100 µl), majd hagyjuk a foltot megszáradni. A száradás után kacsával eltávolítjuk („kihúzzuk”) az életben maradt gombákat a gyógyszer forrásától, majd 48 óráig 35 °C-on inkubáljuk. Negyvennyolc óra után megszámoljuk a kinőtt telepek számát, és ha 3-4 telepnél nem találunk többet, akkor a szer fungicid hatásának tekinthető (10).

Cantón és munkatársai ezt a módszert sarjadzó gombák AMB iránti MFC értékének meghatározására használták (10). A módszer jó korrelációt mutatott az idő-ölés görbék eredményeivel (11, 81).

A rutin diagnosztikában sarjadzó gombák esetében AMB-re nézett MFC érték meghatározásán kívül más gyógyszerekre nézett MFC értékeket még nem határoztak meg ezzel a módszerrel (30, 81).

2.5.5.4. Idő-ölés görbék (time-kill kísérletek)

A Klepser és munkatársai által leírt time-kill metodika (45) előnye abban rejlik, hogy az adott antifungális szer hatásának kitett gomba faj túlélési rátáját a különböző időpontokban vett minták alapján kitűnően lehet mérni.

A használt gombaszuszpenzió kezdő csíraszama 10^5 cfu/mL. Minden kísérletsorozatban 0.5-16×MIC értékben tartalmazzák a csövek a kérdéses gyógyszer koncentrációt a gyógyszermentes kontroll mellett, a végtérfogat 10 mL.

A csövek inkubálása 24 órán keresztül folyamatos rázatás mellett történik, és meghatározott időpontokban, a tízes léptékű hígítások után, 4×30 µl mintát cseppentenek 2-2 db Sabouraud táptalajra.

Szintén Cantón és munkatársai (11) változtattak az inkubációs időn, 24 óra helyett 48 órára növelték, amiben van logika, hiszen ha a MIC értékét 48 óra múlva olvassuk le, akkor logikusabb az idő-ölés kísérleteket is 48 órán keresztül végezni.

Az idő-ölés kísérletek eredményét, hasonlóan a MIC-értékhez, befolyásolja az alkalmazott teszt közeg is (112). Munkacsoportunk CAS esetén a klinikailag jelentős *Candida* fajok ellen AM3 közegben sokkal gyorsabb ölést tapasztalt, mint RPMI-1640 használatakor (112).

A módszernek akadnak hátrányai is. Ezek között lehet említeni, hogy egy kísérletsorozatban általában egy, esetleg kettő törzs vizsgálatát lehet elvégezni. A metodika munka-, és időigényes, tehát a rutin diagnosztikában nem igazán alkalmazható. Ezen kívül az idő-ölés kísérletek csak sarjadzó gombák tesztelésére alkalmasak, mivel penészgombákkal ezidáig csak kis számban végeztek idő-ölés vizsgálatokat (56).

3. 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 DMSO, illetve a módosított módszerben leírt PEG használata a gyógyszer feloldására milyen hatással van a 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 fungisztikus hatás eldöntésére legalkalmasabb idő-ölés görbékkel.

4. Anyagok és módszerek

4.1. 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 *C. tropicalis*, 29 db *C. krusei*, 28 db *C. parapsilosis*, 50 db *C. inconspicua*, 13 db *C. kefyr*, 5 db *C. famata*). Ez utóbbi faj helyett a következő, idő-ölés kísérleteinkben 3 db *C. lusitaniae* és 3 db *C. guilliermondii* törzset használtunk fel. A törzsek nagy része vérmintákból származott, másik részét légúti mintákból, sebekből, peritoneális és pleurális üregekből, valamint hüvelyi mintákból izolálták.

4.2. Sarjadzó gombák azonosítása

A csíratömlő képzés kimutatására a Sabouraud-agaron nőtt tenyészeteket főtális borjúszerűben 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 API ID32C panelt (BioMérieux) használtuk, melynek leolvasása 48 órás inkubációs idő után történt.

Az ID32C-vel kapott eredmények megerősítése *C. inconspicua* és *C. parapsilosis* törzsek esetében molekuláris biológiai módszerek segítségével is megtörtént. Ezek a módszerek magukban foglalták a PCR-ribotipizálást, és a *SADH* gén vizsgálatát restrikciós fragmens hosszúsági polimorfizmus (RFLP) segítségével (52, 109).

4.3. Leveshígítási módszer az érzékenység meghatározására

A mikrodilúciós módszert a CLSI M27-A2 dokumentum ajánlásának figyelembe vételével végeztük el (65). Minden vizsgálatot legalább két alkalommal 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 (táptalaj kontroll) nem tartalmazó 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 (65). 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 (69, 71). A *C. inconspicua* izolátumok esetén a FLU érzékenységet csak a két legújabb törzzsel végeztük el, a többi 48 izolátum esetén a korábbi FLU MIC eredményeinket használtuk (52).

4.4. E-teszt az érzékenység meghatározására

A teszt kivitelezéséhez a gyártó ajánlásának megfelelően, 2 % glükózzal kiegészített RPMI-1640 táptalajt használtunk fel (65). 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.

4.5. Minimális fungicid koncentráció meghatározása posakonazol iránt

A POS MFC meghatározását a Cantón és munkatársai által meghatározott módon végeztük el (10). Minden vizsgálatot legalább két alkalommal hajtottunk végre. Az inokulum csíraszám 10^4 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 (10, 11).

4.6. Idő-ölés görbék (time-kill kísérletek)

Ezeket a kísérleteket a Klepser és munkatársai által leírt módon végeztük el (45). Egyszerre általában két törzzsel indítottunk kísérletet, és minden vizsgálatot legalább kétszer hajtottunk végre.

Mielőtt a kísérleteket elkezdjük volna, megvizsgáltuk, hogy az antifungális szer különböző koncentrációinak (0.5-16xMIC) a jelenléte, hogyan befolyásolja a kezdő csíraszámot (antifungális carryover) (45). A kezdő csíraszám ebben az esetben 500 cfu/mL volt. Miután a gombaszuszpenziót a csövekbe tettük, 4x30 μ L-t azonnal Sabouraud-agarra oltottunk, majd 48 órás inkubálás után a kinőtt telepeket megszámoltuk. Antifungális carryover-ről akkor beszélünk, ha a kinőtt gombatelepek száma a különböző gyógyszerkoncentrációk esetén több mint 25 %-kal kisebb a kontroll csövekből kinőtt gombák számához képest (45).

Az idő-ölés görbék esetén a kezdő csíraszám 10^5 sejt/mL volt (45), a POS koncentrációk értékei a következők voltak: 0.5-16xMIC (0.015-16 mg/L). A *C. parapsilosis* törzseket 32-64xMIC koncentrációkon is teszteltük.

A csöveket folyamatos rázatás mellett 35 °C-os termosztátban inkubáltuk. A csövekből 100-100 μ L-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 (11, 45).

A kimért 100 μ L mennyiségű mintákat tízes léptékű hígítással steril fiziológiás sóoldatban hígítottuk ki (sorozathígítás). Ezt követően 4x30 μ L mintákat cseppentettünk pipettával az egyes Sabouraud-agarok felszínére. Abban az esetben, amikor azt gyanítottuk, hogy a kitenyészett csíraszám <1000 cfu/mL lesz, akkor direkt kioltásokat is alkalmaztunk, vagyis közvetlenül a csövekből oltottunk ki 4x30 μ L-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 (11, 45).

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 (45).

4.7. 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 (65).

POS esetében ilyen kritériumokat még nem határoztak meg (65).

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 (75).

E-teszt esetében, ha a MIC értékek a leveshígításos 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 (75, 77).

5. Eredmények

5.1. 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) (65).

5.2. Posakonazol iránti érzékenység meghatározása leveshígítási módszerrel

A *C. inconspicua*-ra vonatkozó FLU MIC értékek 16-128 mg/L között változtak, azaz a DÉ, illetve a R kategóriákba 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* faj POS-ra vonatkozó MIC értékeinek geometriai átlaga 0.04 és 0.71 mg/L között váltakozott (1. táblázat). A legalacsonyabb MIC értékeket a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* és *C. famata* izolátumok esetén kaptuk. A két 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.

5.3. E-teszt eredményei

Huszonnégy óra elteltével minden *Candida* species kielégítő növekedést mutatott, így a plate-eket 1 nap múlva is könnyen lehetett értékelni (1. és 2. táblázat).

C. tropicalis, *C. kefyr* és *C. famata* izolátumok kivételével a 24 óra elteltével leolvasott E-teszt eredmények jó korrelációt (≥ 86 %-os) mutattak a standard leveshígítási módszer során kapott eredményekkel (2. táblázat).

Egyetlen *C. albicans* törzs esetében (melynek a leveshígítási 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 (broth microdilution method) MIC értékkel azonos eredményt, vagyis MIC > 8 mg/L.

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

Negyvennyolc 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 fokozat körül rendkívül rossz (16.7 %) volt.

1. táblázat.: POS *in vitro* aktivitása a tesztelt *Candida* izolátumokkal szemben különböző vizsgálati módszerek felhasználásával

Vizsgált törzsek	Vizsgálati módszer	GM ¹ (mg/L)	MIC értékek (mg/L)	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)
<i>C. albicans</i> (32)	MIC _{DMSO} ²	0.04	0.015->8	0.03	0.06
	MIC _{PEG} ³	0.04	0.015->8	0.03	0.06
	E-teszt 24 h	0.04	0.015-0.12	0.03	0.06
	E-teszt 48 h	0.06	0.015-0.12	0.06	0.12
<i>C. glabrata</i> (30)	MIC _{DMSO}	0.71	0.25->8	0.5	1
	MIC _{PEG}	0.89	0.25->8	1	1
	E-teszt 24 h	1.1	0.25->8	1	2
	E-teszt 48 h	3.91	1->8	4	8
<i>C. tropicalis</i> (21)	MIC _{DMSO}	0.05	0.015-0.06	0.06	0.06
	MIC _{PEG}	0.05	0.015-0.12	0.06	0.06
	E-teszt 24 h	0.05	0.015-0.25	0.03	0.12
	E-teszt 48 h	0.09	0.015-0.25	0.12	0.25
<i>C. krusei</i> (29)	MIC _{DMSO}	0.22	0.06-0.5	0.25	0.5
	MIC _{PEG}	0.21	0.06-0.5	0.25	0.5
	E-teszt 24 h	0.23	0.12-0.5	0.25	0.5
	E-teszt 48 h	0.47	0.25-1	0.5	1

1. táblázat. (folytatás)

Vizsgált törzsek	Vizsgálati módszer	GM ¹ (mg/L)	MIC értékek (mg/L)	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)
<i>C. parapsilosis</i> (28)	MIC _{DMSO}	0.06	0.03-0.12	0.06	0.12
	MIC _{PEG}	0.04	0.015-0.12	0.03	0.06
	E-teszt 24 h	0.04	0.015-0.12	0.03	0.12
	E-teszt 48 h	0.06	0.03-0.25	0.06	0.12
<i>C. inconspicua</i> (50)	MIC _{DMSO}	0.21	0.12-0.25	0.25	0.25
	MIC _{PEG}	0.15	0.06-0.25	0.12	0.25
	E-teszt 24 h	0.17	0.06-0.5	0.12	0.25
	E-teszt 48 h	0.36	0.12-1	0.5	0.5
<i>C. kefyr</i> (13)	MIC _{DMSO}	0.08	0.03-0.25	0.06	0.12
	MIC _{PEG}	0.09	0.03-0.25	0.12	0.25
	E-teszt 24 h	0.04	0.03-0.12	0.03	0.06
	E-teszt 48 h	0.08	0.03-0.12	0.06	0.12
<i>C. famata</i> (5)	MIC _{DMSO}	0.05	0.03-0.06	0.06	NA ⁴
	MIC _{PEG}	0.03	0.03-0.03	0.03	NA ⁴
	E-teszt 24 h	0.02	0.015-0.03	0.015	NA ⁴
	E-teszt 48 h	0.02	0.015-0.03	0.03	NA ⁴

¹ Geometriai átlag

² Kapott MIC értékek DMSO-t használva oldószerként (standard módszer)

³ Kapott MIC értékek PEG-t használva oldószerként

⁴ Nem alkalmazható

2. táblázat: A leveshígítási módszer POS MIC értékeinek összehasonlítása az E-teszt POS MIC értékekkel

Vizsgált törzsek	Százalékos egyezés ¹	
	E-teszt 24 h	E-teszt 48 h
<i>C. albicans</i> (32)	91%	91%
<i>C. glabrata</i> (30)	90%	16.7%
<i>C. tropicalis</i> (21)	76.2%	71.4%
<i>C. krusei</i> (29)	86.2%	79.3%
<i>C. parapsilosis</i> (28)	92.8%	100%
<i>C. inconspicua</i> (50)	98%	90%
<i>C. kefyr</i> (13)	76.9%	84.6%
<i>C. famata</i> (5)	60%	80%

¹ %-os egyezés, amely a referencia módszerhez viszonyított (NCCLS M27-A2, oldószer a DMSO) MIC értékek százalékait mutatja ± 1 hígítási fokon belül

5.4. Az oldószer hatása a MIC értékekre

Amikor DMSO helyett PEG-t használtunk oldószerként, a MIC értékekben mutatkozó eltérés elenyésző volt. *C. parapsilosis* kivételével (85.7 %), az egyezés egy hígítási fokon belül 97-100 % volt (3. táblázat).

A táblázatból kiderül az is, hogy a MIC értékek *C. glabrata* és *C. kefyr* esetében általában magasabbak voltak, amikor a POS oldószerként PEG-t használtunk.

A MIC érték a *C. tropicalis*, *C. krusei* és *C. inconspicua* esetén ≥ 60 %-ban azonos volt a két oldószer esetén.

3. táblázat.: Az oldószerek hatása a POS MIC értékekre

Vizsgált törzsek	Átlagos egyezés ¹	A vizsgált izolátumok %-a a MIC _{DMSO} ² -hoz viszonyítva		
		Azonos	MIC _{DMSO} magasabb, mint MIC _{PEG} ³	MIC _{DMSO} alacsonyabb, mint MIC _{PEG}
<i>C. albicans</i> (32)	97%	31.3%	31.3%	37.4%
<i>C. glabrata</i> (30)	100%	46.7%	10%	43.3%
<i>C. tropicalis</i> (21)	100%	66.7%	14.3%	19%
<i>C. krusei</i> (29)	100%	75.9%	17.2%	6.9%
<i>C. parapsilosis</i> (28)	85.7%	39.3%	57.1%	3.6%
<i>C. inconspicua</i> (50)	98%	60%	40%	0%
<i>C. kefyr</i> (13)	100%	46.2%	15.4%	38.4%
<i>C. famata</i> (5)	100%	40%	60%	0%

¹ A MIC értékek %-os egyezése ± 1 hígítási fokon belül

² Kapott MIC értékek DMSO-t használva oldószerként

³ Kapott MIC értékek PEG-t használva oldószerként

5.5. Minimális fungicid koncentráció eredményei

Mint már azt az anyagok és módszerek fejezetben leírtam, a MFC meghatározás során magasabb csíraszámú inokulumokkal (10^4 sejt/mL) dolgoztunk. A 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 (≤ 2 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 (4. táblázat).

Ezzel szemben *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* törzsek esetében a POS egyértelműen fungisztikus hatásúnak mutatkozott (4. táblázat).

4. táblázat: *Candida* fajok posakonazolra (POS) vonatkoztatott MFC értékeinek a megoszlása, MFC értékek geometriai közép értékei és a vizsgált izolátumok MFC_{50/90} értékei

Törzsek	MFC értékek (mg/L) megoszlása										
	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	>8	GM ₁	MFC érték	MFC _{50/90}
<i>C. albicans</i> (32)	-	-	-	-	-	-	-	32	>8	>8	>8/>8
<i>C. glabrata</i> (30)	-	-	-	-	-	-	-	30	>8	>8	>8/>8
<i>C. tropicalis</i> (21)	-	-	-	-	-	-	-	21	>8	>8	>8/>8
<i>C. krusei</i> (29)	-	-	1	12	11	3	2	-	1.69	0.5-8	2/4
<i>C. parapsilosis</i> (28)	-	-	3	10	7	-	8	-	2	0.5-8	2/8
<i>C. inconspicua</i> (50)	1	7	23	19	-	-	-	-	0.57	0.12-1	0.5/1
<i>C. kefyr</i> (13)	-	-	8	-	1	1	1	2	1.38	0.5->8	0.5/>8
<i>C. lusitaniae</i> (3)	-	-	-	-	3	-	-	-	2	2	NA ²
<i>C. guilliermondii</i> (3)								3	>8	>8	NA ²

¹ Geometriai átlag

² Nem alkalmazható

5.6. Idő-ölés görbék (time-kill) kísérletek eredményei

A vizsgált izolátumok és ATCC tesztörzsek MIC, illetve MFC értékeit az 5. táblázat rögzíti.

5. 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 kísérletekben antifungális carryover-t nem tapasztaltunk.

A klinikailag jelentős *Candida* fajok közül a POS fungicid hatásának 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 hatásának bizonyult, a legjobb fungicid hatást 48 óra múlva figyelhettük meg. A 9 klinikai izolátumból 7 esetén már az 1 mg/L

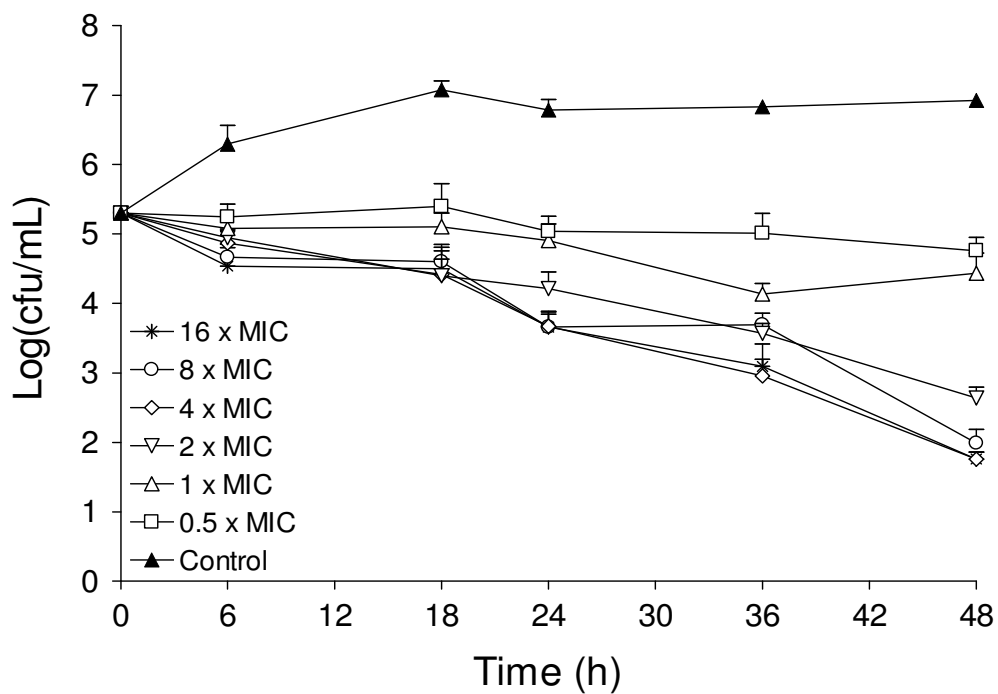
(4xMIC) koncentrációjú POS is fungicidnek bizonyult; a maradék kettő (6577 és az 5029-es számú izolátum) esetén pedig 2 mg/L (8xMIC) koncentrációjú POS alkalmazásával kaptunk legalább 99.9 %-os csíraszám csökkenést a kezdő inokulumhoz képest (6. táblázat). A *C. krusei* törzsekre vonatkozó reprezentatív idő-ölés görbe a 4. ábrán látható.

6. táblázat: *C. krusei* törzsek nettó csíraszám változásai a kezdő inokulumhoz képest

Törzsek	MIC/MFC (mg/L)	Nettó csíraszám változás (log ₁₀ cfu/mL)								
		24 h			36 h			48 h		
		1 mg/L	2 mg/L	4 mg/L	1 mg/L	2 mg/L	4 mg/L	1 mg/L	2 mg/L	4 mg/L
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0.25/0.5	-2.12	-2.6	-3.3	-3.3	-3.3	-3.3	-3.3	-3.3	-3.3
<i>C. krusei</i> 9920	0.25/0.5	-1.97	-1.92	-1.77	-2.7	-2.8	-3.28	-3.7	-3.7	-3.70
<i>C. krusei</i> 13226	0.25/1	-1.6	-1.6	-1.47	-2.53	-2.4	-2.2	-3.5	-3.5	-3.5
<i>C. krusei</i> 22855	0.25/2	-1.54	-1.34	-1.67	-2.3	-1.8	-1.9	-3.4	-3.1	-3.4
<i>C. krusei</i> 4363	0.25/1	-1.11	-1.4	-1.71	-2.19	-2.47	-3.45	-3.03	-3.53	-3.53
<i>C. krusei</i> 15367	0.25/1	-1.6	-1.6	-2.25	-2.51	-2.48	-3.13	-3.08	-3.3	-3.78
<i>C. krusei</i> 17965	0.25/1	-1.29	-2.0	-1.44	-2.6	-2.82	-2.64	-3.82	-3.82	-3.82
<i>C. krusei</i> 26074	0.25/2	-2.78	-2.48	-2.63	-3.78	-3.78	-3.78	-3.78	-3.78	-3.78
<i>C. krusei</i> 6577	0.25/8	-0.29	-1.98	-1.75	-1.95	-3.02	-2.63	-2.85	-3.56	-3.56
<i>C. krusei</i> 5029	0.25/4	-0.27	-1.58	-1.58	-2.08	-2.09	-2.72	-2.72	-3.11	-3.64

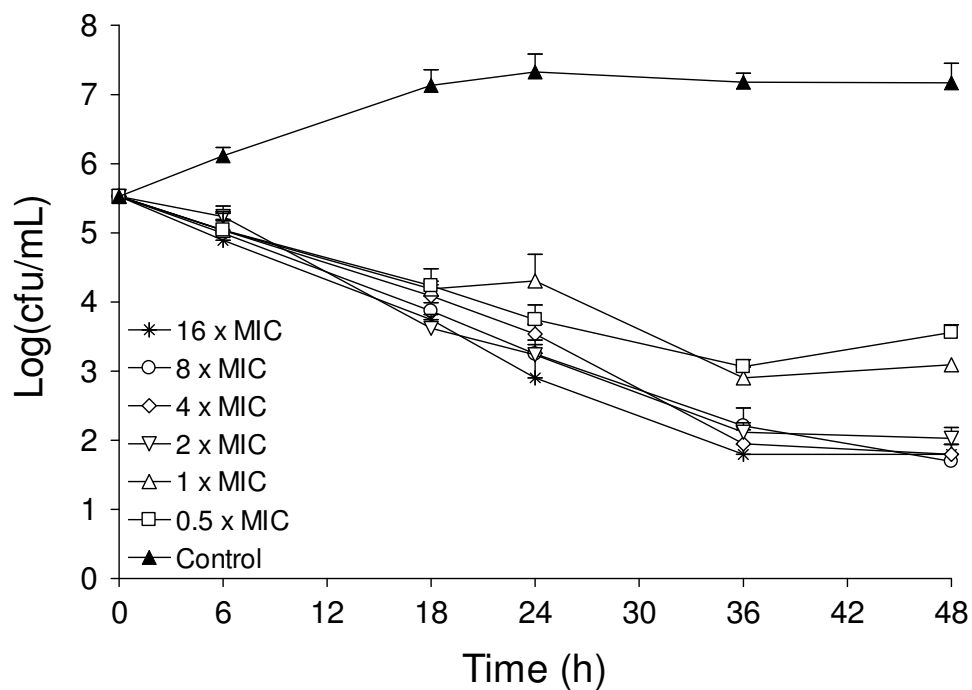
A félkövér számok a fungicid hatás elérését mutatják.

4. ábra: *C. krusei* 22855 (MIC= 0.25 mg/L)



A POS 48 óra múlva mindhárom *C. lusitaniae* izolátum esetén fungicid hatásúnak bizonyult már 0.25 mg/L (4xMIC) koncentráción. 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) (7. táblázat). A *C. lusitaniae* törzsekre vonatkozó reprezentatív idő-ölés görbe az 5. ábrán látható.

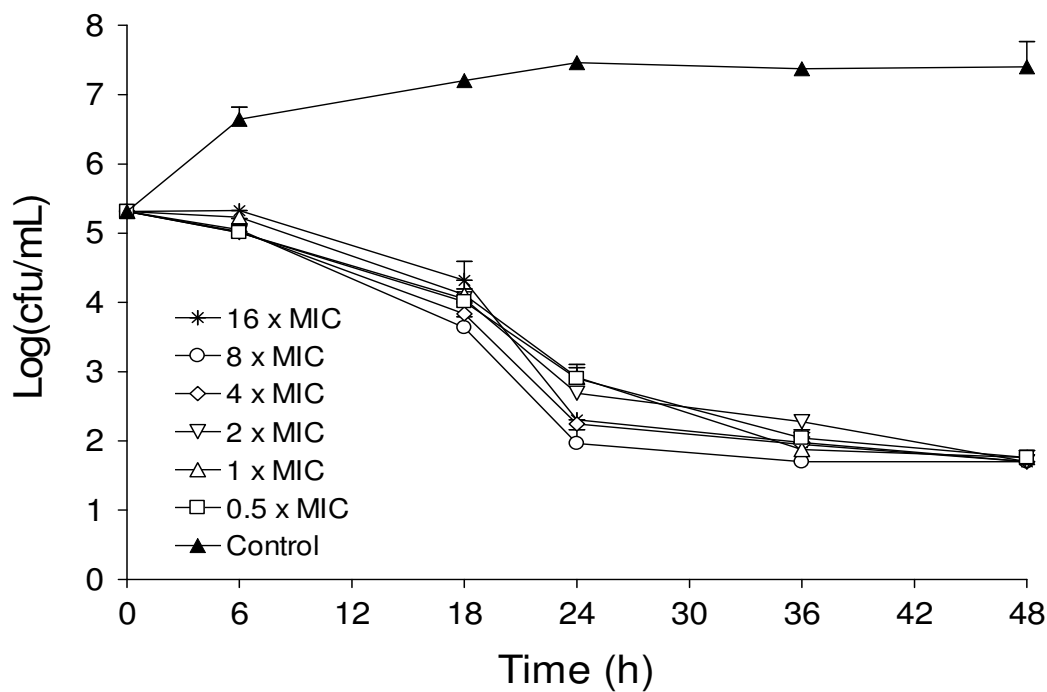
5. ábra: *C. lusitaniae* 982 (MIC = 0.06 mg/L)



A 28773 és a 1558-as számú *C. kefyr* izolátumok ellen a POS 24 óra múlva már 1 mg/L koncentráción (16xMIC) fungicidnek bizonyult (7. táblázat). 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 *C. kefyr* 20340 számú izolátum ellen, korrelációban a MFC értékkel, fungisztatikus hatást mutatott.

A *C. kefyr* törzsekre vonatkozó reprezentatív idő-ölés görbe a 6. ábrán látható.

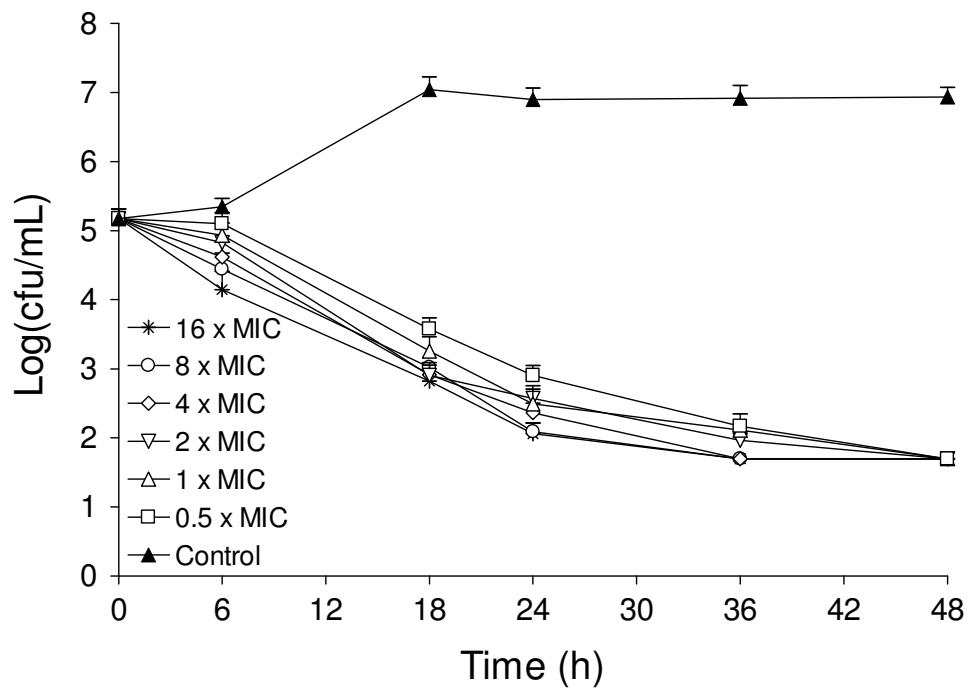
6. ábra: *C. kefyr* 28773 (MIC= 0.06 mg/L)



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. A 4190-es számú izolátum ellen a POS csak 48 óra után mutatott fungicid hatást 0.25-2 mg/L (4-16xMIC) koncentrációkon (7. táblázat).

A *C. inconspicua* törzsekre vonatkozó reprezentatív idő-ölés görbe a 7. ábrán látható.

7. ábra: *C. inconspicua* 22838 (MIC= 0.12 mg/L)



A *C. norvegensis* ATCC 22977 tesztörzsszel szemben a POS 36 óra múlva fungicidnek bizonyult 1-16xMIC koncentrációkon (7. táblázat).

7. táblázat: Nettó változások *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. inconspicua* klinikai izolátumok és ATCC törzsek esetében a kezdő csíraszámhoz képest

Törzsek	MIC/MFC (mg/L)	Nettó csíraszám változás (log ₁₀ cfu/mL)					
		24 h		36h		48h	
		1 mg/L	2 mg/L	1 mg/L	2 mg/L	1 mg/L	2 mg/L
<i>C. lusitaniae</i> 807	0.06/2	-3.07	N.D.	-3.78	N.D.	-3.78	N.D.
<i>C. lusitaniae</i> 982	0.06/2	-1.89	N.D.	-3.57	N.D.	-3.57	N.D.
<i>C. lusitaniae</i> 17401	0.06/2	-3.78	N.D.	-3.78	N.D.	-3.78	N.D.
<i>C. kefyr</i> 28773	0.06/0.5	-3.11	N.D.	-3.46	N.D.	-3.67	N.D.
<i>C. kefyr</i> 1558	0.12/0.5	-3.15	-3.48	-3.48	-3.48	-3.48	-3.48
<i>C. kefyr</i> 20340	0.06/8	+1.18	N.D.	+1.33	N.D.	+1.07	N.D.
<i>C. inconspicua</i> ATCC 16783	0.12/0.5	-3.15	-3.15	-3.38	-3.38	-3.38	-3.38
<i>C. inconspicua</i> 22838	0.12/0.5	-3.12	-3.25	-3.6	-3.6	-3.6	-3.6
<i>C. inconspicua</i> 5040	0.25/0.5	-3.04	-3.11	-3.44	-3.44	-3.44	-3.44
<i>C. inconspicua</i> 17429	0.12/1	-3.25	-3.55	-3.55	-3.55	-3.55	-3.55
<i>C. inconspicua</i> 4190	0.12/1	-1.78	-2.36	-2.91	-2.88	-3.78	-3.78
<i>C. norvegensis</i> ATCC 22977	0.12/0.25	-2.6	-2.03	-3.7	-3.7	-3.7	-3.7

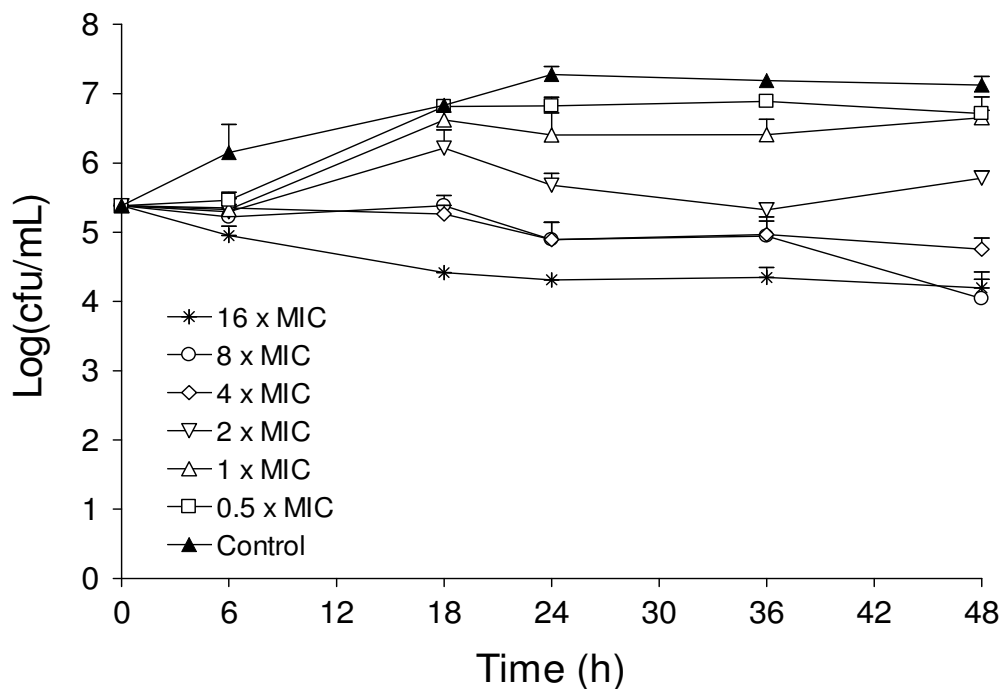
A félkövér számok a fungicid hatás elérését mutatják.

A POS a *C. albicans*, a *C. glabrata*, a *C. tropicalis* és *C. guilliermondii* ellen, megerősítve a MFC meghatározás során kapott értékeket, fungisztikus hatásúnak bizonyult. A POS a *C. albicans*, a *C. tropicalis* és a *C. guilliermondii* izolátumok növekedését 2-16xMIC értéken gátolta (8., 9., 10. ábra). A magas POS MIC-val rendelkező *C. albicans* (> 8 mg/L) izolátum idő-ölés görbéje 16-32 mg/L POS koncentrációkon a kontrollhoz volt hasonló, azaz semmilyen gátlást nem tapasztaltunk.

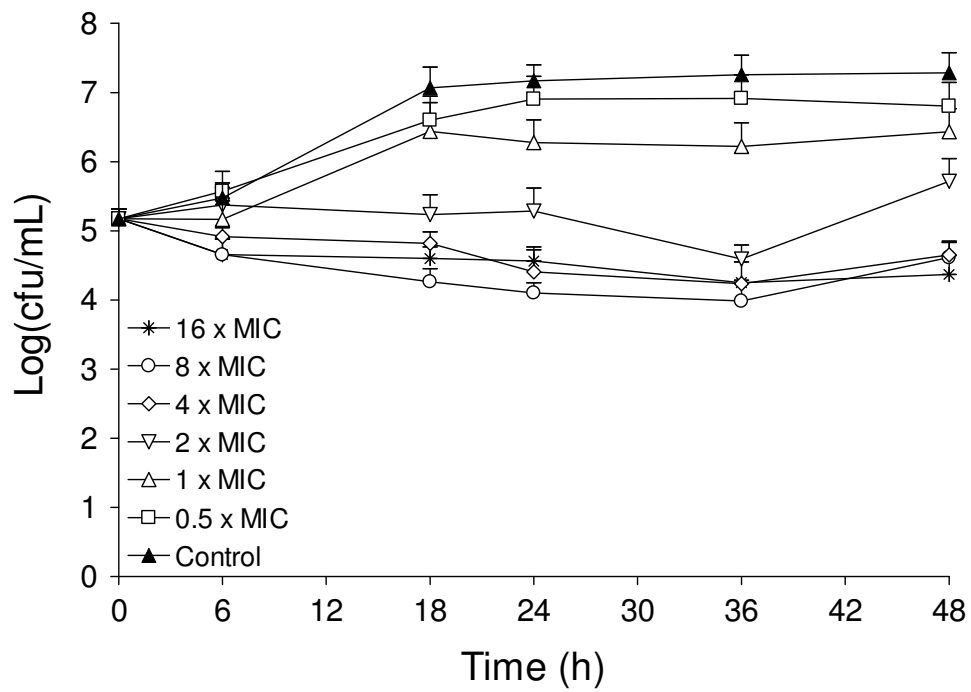
A POS a *C. glabrata* izolátumok ellen csak gyenge gátló hatással rendelkezett; bármely tesztelt POS koncentráción növekedés volt tapasztalható. A legjobb gátló hatást 4-8xMIC értékeken figyelhattuk meg (11. ábra). A magas POS MIC-val (> 8 mg/L) rendelkező *C. glabrata* izolátum idő-ölés görbéje 16-32 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 fungisztikus 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 (12. ábra).

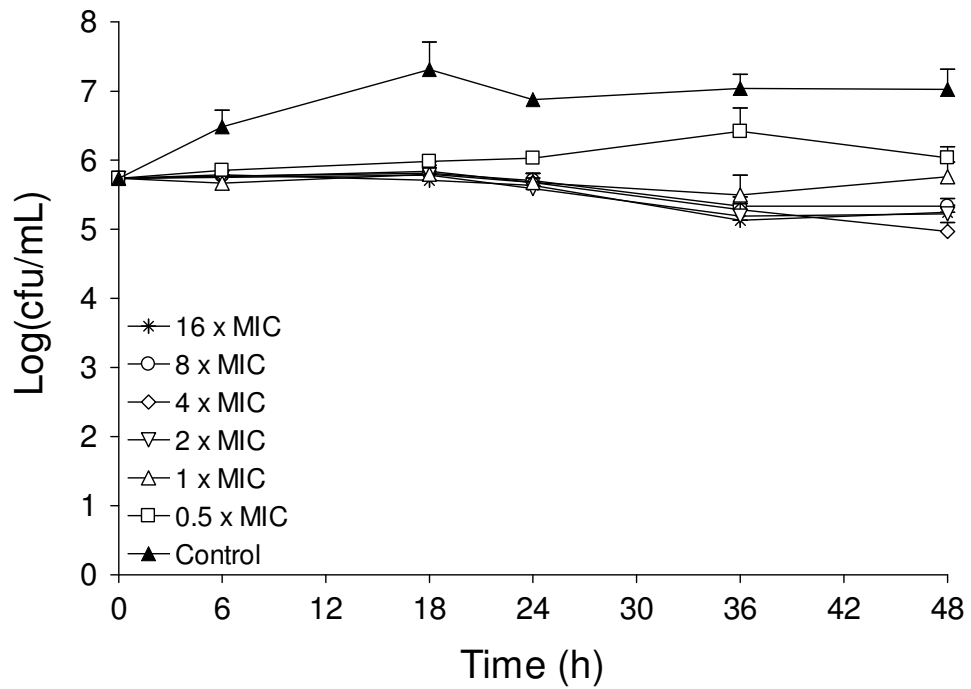
8. ábra: *C. albicans* 7111 (MIC= 0.06 mg/L)



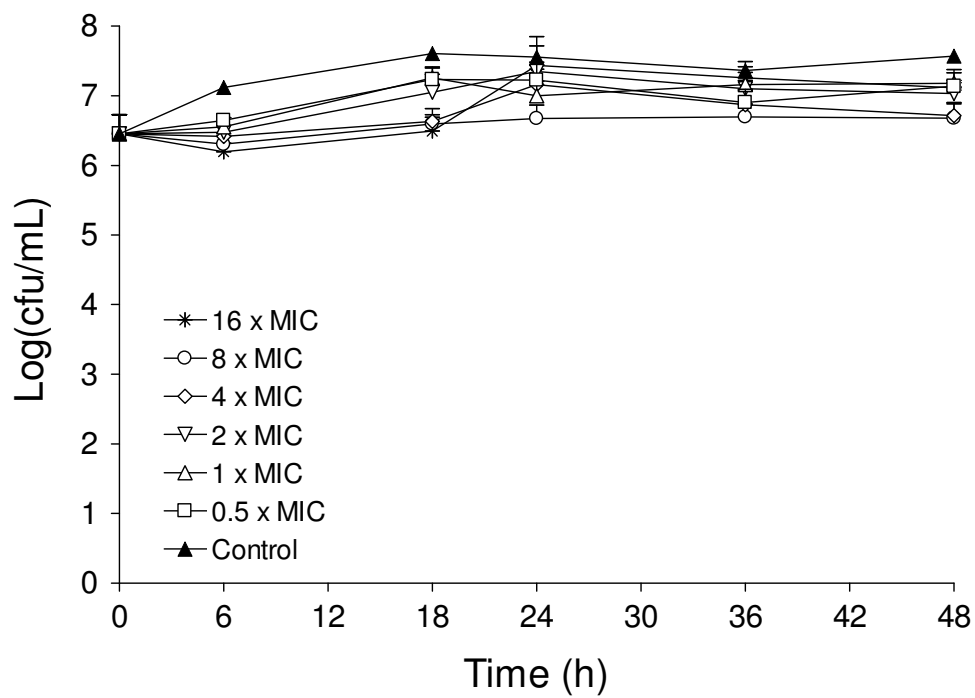
9. ábra: *C. tropicalis* 375 (MIC= 0.06 mg/L)



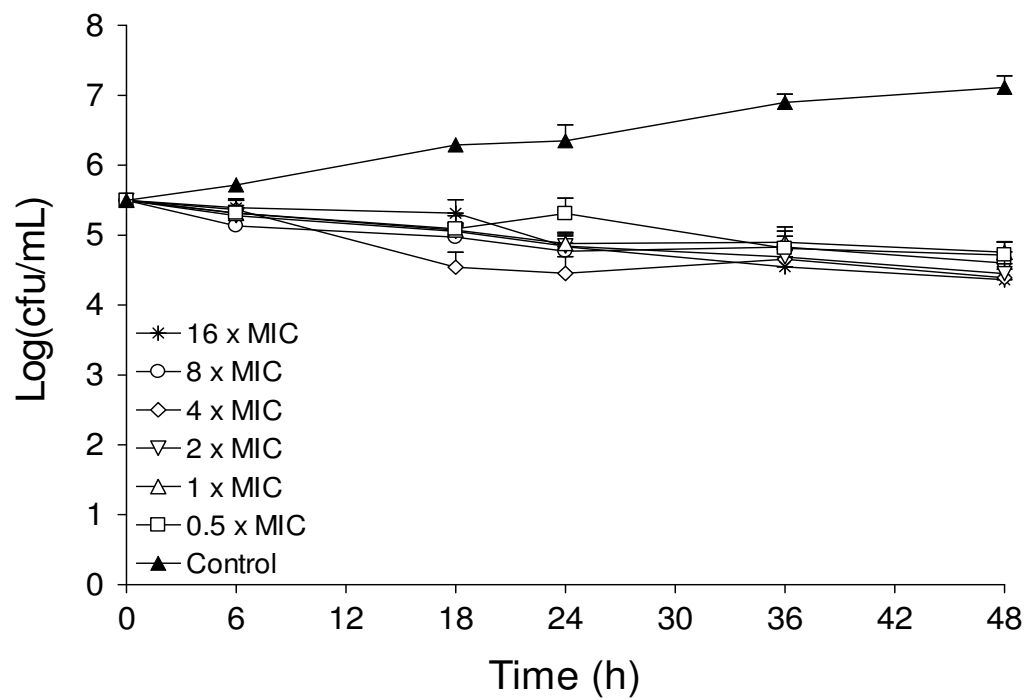
10. ábra: *C. guilliermondii* 15539 (MIC= 0.25 mg/L)



11. ábra: *C. glabrata* 69 (MIC= 0.5 mg/L)



12. ábra: *C. parapsilosis* 25329 (MIC= 0.12 mg/L)



6. Megbeszélés, következtetések

A jól ismert rizikófaktorok (daganatos betegségek, szervtranszplantáció, alacsony vagy magas életkor, sebészi beavatkozások, stb.) következtében az utóbbi három évtizedben jelentős mértékben növekedett a sarjadzó-, és a penészgombák által okozott invazív fertőzések száma (23, 43, 70, 78, 84). A fertőzések 80-90 %-áért a különböző *Candida* fajok, a *C. neoformans*, valamint az *Aspergillus* fajok a felelősek (47, 57).

Az 1970-es évek elejéig a szisztémás kezelésre alkalmas antifungális szerek száma az AMB-re és a griseofulvinra korlátozódott (2). Az AMB minden toxicitása ellenére az utóbbi öt évtizedben is megtartotta vezető szerepét a terápiában, bár jelenleg már igen sok esetben nem a legelsőként választandó szer invazív gombafertőzések esetén (71). Az AMB lipid formulátumainak az alkalmazását a hagyományos dezoxikolát formulátumhoz képest jelentősen korlátozza a magas ár, illetve az a tény, hogy ezen készítmények spektruma ugyanaz maradt, mint az AMB dezoxikolátnak. Azaz, AMB-re R gombák ellen a lipid formulátumok sem lesznek hatékonyak. Megjegyzendő az is, hogy az infúziós kezelések során tapasztalt mellkásfájdalom, diszpnoe és hipoxia igen karakterisztikus mellékhatása lehet a lipid-asszociált AMB készítményeknek (2).

Mivel az 5-FC korlátozott spektruma, valamint a monoterápia során tapasztalt gyorsan kialakuló szekunder rezisztencia miatt nem váltotta be a hozzáfűzött reményeket, igen örömdetes volt az 1990-es évek elején a triazolok, majd az új évezred elején az echinocandinok bevezetése a terápiás gyakorlatba (21, 96).

Az új antibakteriális és antifungális szerek klinikai gyakorlatba való bevezetését először megelőzi a kutatólaboratóriumokban történő *in vitro* tesztelés, standard, elvileg bármelyik laboratóriumban reprodukálható módszerekkel. Ezekkel az eredményekkel az új gyógyszer különböző kórokozók elleni hatása már többé-kevésbé megjósolható.

A sarjadzó-, és penészgombák klinikai szerepe az invazív, életet veszélyeztető fertőzések kialakításában csak évtizedekkel később vált nyilvánvalóvá a bakteriális fertőzésekhez képest (32, 38, 43, 47, 66, 67, 70, 71, 80, 84, 90). Ez sajnos azt is jelentette, hogy azok a standardizált procedúrák, amelyek a bakteriális érzékenységi vizsgálatokban a napi kutatói rutinmunka részei voltak, gyakorlatilag nem is léteztek a gombák esetén.

A standard, leveshígítási makro-, és mikrodilúción alapuló pontos MIC értéket adó érzékenység meghatározási módszert 1997-ben fogadták el sarjadzó gombákra (65). A konszenzusra nagy szükség volt, hiszen a különböző laboratóriumokból származó eredmények között akár 3-4 nagyságrendnyi különbség is lehetett (86). A módszer valóban

alkalmasnak bizonyult a gombák érzékenységeinek a mérésére, amit multicentrikus nemzetközi vizsgálatok is igazoltak (65).

Az invazív bakteriális-, és gombafertőzések egy része esetén kívánatos lehet, hogy a kórokozó el is pusztuljon a kezelés során (71, 81). Ilyen eset lehet neutropéniás betegek véráramának bakteriális-, és gombafertőzéseinek, valamint meningitisz vagy endophtalmitis kezelése (71, 81). Az idő-ölés görbék felvételével, illetve a minimális baktericid koncentráció (MBC) meghatározásával baktériumok esetén könnyen bizonyítani lehetett egy új, vagy régebbi antibakteriális szerről a baktericid, vagy bakteriosztatikus hatást (81). Az *in vitro* észlelt baktericid hatást állatokban, kísérletes endocarditis kezelése esetén bizonyították (92).

Sarjadzó-, és penészgombák esetében az *in vitro* farmakodinámiás kísérletek csak az 1990-es évek végén kezdődtek meg. A baktériumoktól adaptált módszer segítségével Klepser és munkatársai (45) gyakorlatilag az összes szisztémás kezelésre alkalmas antifungális szert tesztelték a klinikailag jelentős sarjadzó gombák ellen. Az antifungális szer *in vitro* észlelt gyenge aktivitása mutatott rá több esetben a klinikai gyakorlat során tapasztalt terápiás sikertelenségre (11, 33, 54, 81). Ezzel a módszerrel lehetett megerősíteni a FLU hatástalanságát *C. krusei*, vagy az AMB kérdéses aktivitását *C. lusitaniae* és *C. krusei* ellen (54, 77).

A sarjadzó gombákkal végzett idő-ölés görbék megerősítették a korábbi feltevéseket, amelyek nagy általánosságban a következők: a poliének fungicid, míg az azolok és triazolok fungisztatikus hatásúak (71, 81).

Az idő-ölés görbékkel végzett kísérletek sok időt és sok munkát igényelnek. A 90-99 %-os fungicid hatás mérését már a standard mikrodilúciós MIC meghatározási módszer bevezetése után nem sokkal alkalmazni kezdték a MFC meghatározása során. A módszert használták nemcsak a sarjadzó-, de a penészgombák MFC értékének a meghatározására is (28, 56). A VOR és a POS több penészgomba faj ellen fungicid aktivitást mutatott, de inkább fungisztatikusnak mutatkozott a sarjadzó gombák ellen (8, 22, 28, 46, 55, 56, 95). Mindazonáltal, a valódi áttörést a MFC meghatározásban a kezdeti csíraszám emelése jelentette 10^4 cfu/mL-re (10). Alacsony MFC értékeket lehetett megfigyelni AMB-re nézve a sarjadzó gombák nagy része esetén, de sok penészgomba fajnál is (10, 28).

Az emelt csíraszámmal kapott MFC eredményeket AMB esetén egy következő kísérletben Cantón és munkatársai a 'gold standard'-nak tartott idő-ölés görbékkel megerősítették. Az idő-ölés görbék vizsgálatát 24 órától 48 órára tolták ki, így a kapott eredmények összemérhetővé váltak a 48 órás inkubációs idő után kapott MFC értékekkel.

Bár az echinocandinok esetén elkezdődtek az emelt kezdő csíraszámokkal végzett MFC meghatározások (28, 100, 112), és több esetben elvégezték az idő-ölés görbék felvételét is, az új triazolok esetén kevés adat állt rendelkezésre ebben a témában.

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 leveshígítósos mikrodilúciós módszer szerint, egyezve a nemzetközi adatokkal (3, 70), kitűnő *in vitro* aktivitást mutatott a klinikai anyagokból izolált *Candida* fajok ellen. A legmagasabb MIC₉₀ értéket *C. glabrata* esetén mértük, bár ezek az adatok alacsonyabbak a Pfaller és munkatársai által kapott 4 mg/L-es MIC₉₀ értéknél (74, 76).

Bebizonyítottuk, hogy a FLU-ra R *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, melyet Groll és Walsh (37) írt le. 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 (1. táblázat). Ezek az eredmények szintén eltértek a Pfaller és munkatársai (76) által kapottaktól, 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. Ezek az eredmények hasonlóak az Ostrosky-Zeichner által (70) kapott eredményekhez. A különböző szerzők által kapott POS MIC értékek jobb összehasonlíthatósága miatt azonban az a véleményünk, hogy a standard módszerben (64, 65) leírt DMSO-t használjuk 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 (28). 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 leveshígításos módszer eredményei között rendkívül gyenge egyezést tapasztaltunk, a 48 órás inkubációs idő után mért E-teszt értékek klinikai relevanciája nem zárható ki *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 (6., 7. táblázat). Figyelemre méltó, hogy az 1 mg/L-es POS koncentráció könnyen elérhető a vérben (1, 16, 63), ezért ezeknek az eredményeknek terápiás jelentősége lehet.

A POS fungicid aktivitása 1 mg/L koncentráción a *C. krusei* törzsek többségénél, illetve a 4190-es számú *C. inconspicua* izolátum esetén csak 48 óra után volt megfigyelhető (6., 7. táblázat). A 6577 és az 5029-es számú *C. krusei* klinikai izolátumoknál 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 (nem közölt saját adatok), 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 egyetlen esetben sem igazolták a POS fungicid hatását, annak ellenére, hogy 32-64xMIC értékeken is elvégeztük a kísérleteket. Ennek okát csak valószínűsíteni tudjuk. Andes

és munkatársai (1) *in vivo* farmakodinámiás egérkísérletükben *C. albicans* esetén hosszú ideig (20-30 óra közötti) tartó növekedésgátlást figyeltek meg *per os* POS terápia során (posztantifungális hatás). Bár *C. parapsilosis* esetén még nem vizsgálták, valószínű, hogy a POS szintén hosszú ideig tartó növekedésgátlást idéz elő a gyógyszer expozíció megszűnése után is. Ezért lehetett MFC kísérleteinkben alacsony MFC értékeket kapni a *C. parapsilosis* törzsek többségénél. Lehetséges, hogy a 48 óra helyetti 72 órás inkubációs idő lehetővé tette volna a növekedésben gátolt, de élő *C. parapsilosis* sejtek detektálását Sabouraud-agaron.

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 (97), 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 (16, 63). 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 (63). Ráadásul a POS nagyobb, mint 90 %-ban kötődik fehérjékhez a szérumban, csökkentve ezzel a szabad, biológiailag aktív POS koncentrációt (63). Ezen tények jelenleg meghatározzák a POS alkalmazhatóságát a súlyos, invazív fertőzések kezelésében, bár profilaxisra, akár csontvelőtranszplantált betegek esetén, kiválóan alkalmasnak tűnik (15, 110).

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

7. Eredmények összefoglalása

A POS kitűnő *in vitro* aktivitást mutatott a kísérleteinkben használt *Candida* fajokkal szemben. A POS-ra kapott geometriai átlag MIC értékek, a *C. glabrata*, *C. krusei*, és a *C. inconspicua* fajok kivételével, kisebb, mint 0.1 mg/L értékeket adtak.

Bebizonyítottuk, hogy a FLU iránt csökkent érzékenységet mutató *C. krusei* és *C. inconspicua* fajok nem mutatnak keresztrezisztenciát a POS iránt.

Az eredményeket áttekintve az E-teszt leolvasása 24 óra elteltével jobb korrelációt mutatott a CLSI által leírt standard levesthígítási módszer MIC értékeivel, mint 48 óra után.

Ennek megfelelően a rutin diagnosztikában a 24 órás inkubációs időt javasolnánk az E-teszt használata során. Az E-teszt a mi kísérleteinkben is megbízható *in vitro* érzékenységi módszernek bizonyult.

A PEG használatának hatása a MIC értékekre csak csekély mértékűnek bizonyult. Kutatócsoportunk azonban oldószerként a DMSO használatát javasolja (CLSI által leírt standard levesthígítási módszer), ezáltal megkönnyíthetjük a különböző szerzők által kapott eredmények összehasonlítását.

További kísérleteinket elemezve, a POS hatásfokát még jobban felderítő vizsgálatokban (MFC és idő-ölés görbék) a gyógyszer fungicid hatást mutatott minden *C. krusei*, *C. inconspicua* és *C. lusitaniae* törzs ellen 48 órán belül, valamint fungisztatikusnak bizonyult minden *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* és *C. guilliermondii* törzs tekintetében. Ezeket az eredményeket áttekintve láthatjuk, hogy a POS számos, a klinikai gyakorlatban gyakran előforduló *Candida* törzs esetében fungicid hatást mutat.

Az egyes *Candida* törzsekre kapott MFC értékek jól korreláltak az idő-ölés kísérletekben kapott eredményekkel. Ennek alapján a könnyebben kivitelezhető MFC meghatározás használható lehet súlyosabb állapotú betegek esetében.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni elsősorban témavezetőmnek, dr. Majoros Lászlónak, hogy érdeklődésemet felkeltette ezen kutatási témában, valamint hogy hasznos tanácsaival, útmutatásával mindig segítségemre volt.

Köszönetemet szeretném kinyilvánítani Pappné Falusi Erzsébetnek, akinek nélkülözhetetlen munkájával a laboratóriumi kísérleteket kivitelezhettem.

Köszönet illeti dr. Kardos Gábort, Hartmann Zsoltot, Magyar Józsefnét, Andirkó Istvánt, valamint az Orvosi Mikrobiológiai Intézet minden munkatársát, hogy segítő munkájukkal lehetővé tették kutatásaimat, és PhD értekezésem megírását.

Köszönöm Gergely Lajos Professzor Úrnak, valamint dr. Kónya Józsefnek, hogy intézetükben lehetővé tették számomra a PhD tanulmányt, valamint a kísérletes munkát.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom családomnak, valamint András Attilának és Olajos Ildikónak, kitartásukért, támogatásukért, ösztönző magatartásukért.

9. Irodalomjegyzék

1. Andes, D., K. Marchillo, R. Conklin, G. Krishna, F. Ezzet, A. Cacciapuoti, D. Loebenberg. 2004. Pharmacodynamics of a new triazole, posaconazole, in a murine model of disseminated candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:137-142.
2. Ashley Dodds, E. S., R. Lewis, J. S. Lewis, C. Martin, D. Andes. 2006. Pharmacology of Systemic Antifungal Agents. *Clin. Infect. Dis.* 43: S28-39.
3. Barchiesi, F., D. Arzeni, A. W. Fothergill, L. F. Di Francesco, F. Caselli, M. G. Rinaldi, G. Scalise. 2000. In vitro activities of the new antifungal triazole SCH 56592 against common and emerging yeast pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:226-229.
4. Barchiesi, F., E. Spreghini, S. Tomassetti, A. Della Vittoria, D. Arzeni, E. Manso, G. Scalise. 2006. Effects of caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:2719-2727.
5. Bartizal, C., F. C. Odds. 2003. Influences of methodological variables on susceptibility testing of caspofungin against *Candida* species and *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2100-2107.
6. Bennett, F., A. K. Saxena, R. G. Lovey, Y. T. Liu, N. M. Patel, P. Pinto, R. Pike, E. Jao, V. M. Girijavallabhan, A. K. Ganguly, D. Loenberg, H. Wang, A. Cacciapuoti, E. Moss, F. Menzel, R. S. Hare, A. Nomeir. 2006. Hydroxylated analogues of the orally active broad spectrum antifungal, Sch 51048 (1), and the discovery of posaconazole (Sch 56592; 2 or (S,S)-5). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16:186-190.
7. Bikandi, J., R. S. Millan, M. D. Moragues, G. Cebas, M. Clarke, D. C. Coleman, D. J. Sullivan, G. Quindos, J. Ponton. 1998. Rapid identification of *Candida dubliniensis* by indirect immunofluorescence based on differential localization of antigens on *C. dubliniensis* blastospores and *Candida albicans* germ tubes. *J. Clin. Microbiol.* 36:2428-2433.
8. Cacciapuoti, A., D. Loebenberg, E. Corcoran, F. Menzel, Jr., E. L. Moss, Jr., C. Norris, M. Michalski, K. Raynor, J. Halpern, C. Mendrick, B. Arnold, B. Antonacci, R. Parmegiani, T. Yarosh-Tomaine, G. H. Miller, R. S. Hare. 2000. In vitro and in vivo activities of SCH 56592 (posaconazole), a new triazole antifungal agent, against *Aspergillus* and *Candida*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:2017-2022.
9. Calderone, R. A., W. A. Fonzi. 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 9:327-335.

10. Cantón, E., J. Pemán, A. Viudes, G. Quindós, M. Gobernado, A. Espinel-Ingroff. 2003. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 45:203-206.
11. Cantón, E., J. Pemán, M. Gobernado. 2004. Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2477-2482.
12. Capilla, J., C. Serena, F. J. Pastor, M. Ortoneda, J. Guarro. 2003. Efficacy of voriconazole in treatment of systemic scedosporiosis in neutropenic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3976-3978.
13. Chandra, J., M. Kuhn, P. K. Mukherjee, L. L. Hoyer, T. McCormick, M. A. Ghannoum. 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* 183:5385-5394.
14. Charlier, C., E. Hart, A. Lefort, P. Ribaud, F. Dromer, D. W. Denning, O. Lortholary. 2006. Fluconazole for the treatment of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years? *J. Antimicrob. Chemother.* 57:384-410.
15. Cornely, O. A., J. Maertens, D. J. Winston, J. Perfect, A. J. Ullmann, T. J. Walsh, D. Helfgott, J. Holowiecki, D. Stockelberg, Y. T. Goh, M. Petrini, C. Hardalo, R. Suresh, D. Angulo-Gonzalez. 2007. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N. Engl. J. Med.* 356:348-359.
16. Courtney, R., D. Wexler, E. Radwanski, J. Lim, M. Laughlin. 2004. Effect of food on the relative bioavailability of two oral formulations of posaconazole in healthy adults. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 57:218-222.
17. Cuenca-Estrella, M., A. Gomez-Lopez, E. Mellado, M. J. Buitrago, A. Monzon, J. L. Rodriguez-Tudela. 2006. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:917-921.
18. Davey, K. G., A. D. Holmes, E. M. Johnson, A. Szekely, D. W. Warnock. 1998. Comparative evaluation of FUNGITEST and broth microdilution methods for antifungal susceptibility testing of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* 36:926-930.
19. De Bernardis, F., L. Agatensi, I. K. Ross, G. W. Emerson, R. Lorenzini, P. A. Sullivan, A. Cassone. 1990. Evidence for a role for secreted aspartate proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis. *J. Infect. Dis.* 161:1276-1283.
20. De Bernardis, F., P. A. Sullivan, A. Cassone. 2001. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Med. Mycol.* 39:303-313.

21. Denning, D. W. 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet*. 362:1142-1151.
22. Di Bonaventura, G., I. Spedicato, C. Picciani, D. D'Antonio, R. Piccolomini. 2004. 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.* 48:4453-4456.
23. Diekema, D. J., M. A. Pfaller, R. N. Jones. SENTRY Participants Group. 2002. Age-related trends in pathogen frequency and antimicrobial susceptibility of bloodstream isolates in North America: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2000. *J. Antimicrob. Agents.* 20:412-418.
24. Dupont, B. 2002. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.* 49(Suppl.S1):31-36.
25. Ernst, E. J., M. E. Klepser, M. E. Klepser, S. A. Messer, M. A. Pfaller. 1999. In vitro pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 33:75-80.
26. Ernst, E. J., E. E. Roling, C. R. Petzold, D. J. Keele, M. E. Klepser. 2002. In vitro activity of micafungin (FK-463) against *Candida* spp.: microdilution, time-kill, and postantifungal-effect studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3846-3853.
27. Ernst, E. J., K. Yodoi, E. E. Roling. 2002. Rates and extents of antifungal activities of amphotericin B, flucytosine, fluconazole, and voriconazole against *Candida lusitanae* determined by microdilution, Etest, and time-kill methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:578-581.
28. Espinel-Ingroff, A. 1998. Comparison of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 36:2950-2956.
29. Espinel-Ingroff, A. 2001. In vitro fungicidal activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. *J. Clin. Microbiol.* 39:954-958.
30. Espinel-Ingroff, A. 2003. In vitro antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature. *Rev. Iberoam. Micol.* 20:121-136.

31. Fenn, J. P., H. Segal, B. Barland, D. Denton, J. Whisenant, H. Chun, K. Christofferson, L. Hamilton, K. Carroll. 1994. Comparison of updated Vitek Yeast Biochemical Card and API 20C yeast identification systems. *J. Clin. Microbiol.* 32:1184-1187.
32. Fidel, P. L., Jr., J. A. Vazquez, J. D. Sobel. 1999. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:80-96.
33. Fields, B. T., J. H. Bates, R. S. Abernathy. 1970. Amphotericin B serum concentrations during therapy. *Appl. Microbiol.* 19:955-959.
34. Fleischhacker, M., C. Radecke, B. Schulz, M. Ruhnke. 2008. Paradoxical growth effects of the echinocandins caspofungin and micafungin, but not of anidulafungin, on clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27:127-131.
35. George, D., P. Miniter, V. T. Andriole. 1996. Efficacy of UK-109496, a new azole antifungal agent, in an experimental model of invasive aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:86-91.
36. Ghannoum, M.A., L. B. Rice. 1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *J. Clin. Microbiol.* 12:501-517.
37. Groll, A. H., T. J. Walsh. 2005. Posaconazole: clinical pharmacology and potential for management of fungal infections. *Expert Rev. Infect. Ther.* 3:467-487.
38. Gudlaugsson, O., S. Gillespie, K. Lee, B. J. Vande, J. Hu, S. Messer, L. Herwaldt, M. Pfaller, D. Diekema. 2003. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin. Infect. Dis.* 37:1172-1177.
39. Hsu, L. Y., G. E. Minah, D. E. Peterson, J. R. Wingard, W. G. Merz, V. Altomonte, C. A. Tylenda. 1990. Coaggregation of oral *Candida* isolates with bacteria from bone marrow transplant recipients. *Infect. Immun.* 28:2621-2626.
40. Hube, B., F. Stehr, M. Bossenz, A. Mazur, M. Kretschmar, W. Schafer. 2000. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch. Microbiol.* 174:362-374.
41. Hube, B., J. Naglik. 2001. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology.* 147:1997-2005.
42. Ibrahim, A. S., F. Mirbod, S. G. Filler, Y. Banno, G. T. Cole, Y. Kitajima, J. E. Edwards, Jr., Y. Nozawa, M. A. Ghannoum. 1995. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 63:1993-1998.

43. Kao, A. S., M. E. Brandt, W. R. Pruitt, L. A. Conn, B. A. Perkins, D. S. Stephens, W. S. Baughman, A. L. Reingold, G. A. Rothrock, M. A. Pfaller, R. W. Pinner, R. A. Hajjeh. 1999. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin. Infect. Dis.* 29:1164-1170.
44. Kirkpatrick, W. R., R. K. McAtee, A. W. Fothergill, M. G. Rinaldi, T. F. Patterson. 2000. Efficacy of voriconazole in a guinea pig model of disseminated invasive aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:2865-2868.
45. Klepser, M. E., E. J. Ernst, R. E. Lewis, M. E. Ernst, M. A. Pfaller. 1998. Influence of test conditions on antifungal time kill-curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:1207-1212.
46. Klepser, M. E., D. Malone, R. E. Lewis, E. J. Ernst, M. A. Pfaller. 2000. Evaluation of voriconazole pharmacodynamics using time-kill methodology. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1917-1920.
47. Kontoyiannis, D. P., R. E. Lewis. 2002. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet.* 359:1135-1144.
48. Kuhn, D. M., P. K. Mukherjee, T. A. Clark, C. Pujol, J. Chandra, R. A. Hajjah, D. W. Warnock, D. R. Soll, M. A. Ghannoum. 2004. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerg. Infect. Dis.* 10:1074-1081.
49. Kurtzman, C. P., C. J. Robnett. 1997. Identification of clinically important Ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 35:1216-1223.
50. Kurtzman, C. P., C. J. Robnett. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Leeuwenhoek.* 73:331-371.
51. Lewis, R. E., M. E. Klepser, M. Pfaller. 2000. In vitro pharmacodynamic characteristics of flucytosine determined by time-kill methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 36:101-105.
52. Majoros L., G. Kardos, Á. Belák. 2003. Restriction enzyme analysis of ribosomal DNA shows that *Candida inconspicua* clinical isolates can be misidentified as *Candida norvegensis* with traditional diagnostic procedures. *J. Clin. Microbiol.* 41:5250-5253.
53. Majoros, L., G. Kardos, P. Feiszt, B. Szabó. 2005. Efficacy of amphotericin B and flucytosine against fluconazole-resistant *Candida inconspicua* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 56:253-254.

54. Majoros, L., I. Szegedi, G. Kardos, C. Erdész, J. Kónya, C. Kiss. 2006. Slow response of invasive *Candida krusei* infection to amphotericin B in a clinical time-kill study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25:803-806.
55. Manavathu, E. K., J. Cutright, P. H. Chandrasekar. 1999. Comparative study of susceptibilities of germinated and ungerminated conidia of *Aspergillus fumigatus* to various antifungal agents. *J. Clin. Microbiol.* 37:858-861.
56. Manavathu, E. K., J. L. Cutright, D. Loebenberg, P. H. Chandrasekar. 2000. A comparative study of the in vitro susceptibilities of clinical and laboratory-selected resistant isolates of *Aspergillus* spp. to amphotericin B, itraconazole, voriconazole and posaconazole (SCH 56592). *J. Antimicrob. Chemother.* 46:229-234.
57. Masouka, J. 2004. Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges. *Clin. Microbiol. Review* 17:281-310.
58. Mikamo, H, Y. Sato, T. Tamaya. 2000. In vitro antifungal activity of FK463, a new water-soluble echinocandin-like lipopeptide. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:485-487.
59. Mills, W., R. Chopra, D. C. Linch, A. H. Goldstone. 1993. Liposomal amphotericin B in the treatment of fungal infections in neutropenic patients: a single-centre experience of 133 episodes in 116 patients. *British J. of Haematology.* 86:754-760.
60. Moosa, M. Y., J. D. Sobel, H. Elhalis, W. Du, R. A. Akins. 2004. Fungicidal activity of fluconazole against *Candida albicans* in a synthetic vagina-simulative medium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:161-167.
61. Morace, G., L. Polonelli, GISIA Group. 2005. Voriconazole activity against clinical yeast isolates: a multicentre Italian study. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26:247-253.
62. Munayyer, H. K., P. A. Mann, A. S. Chau, T. Yarosh-Tomaine, J. R. Greene, R. S. Hare, L. Heimark, R. E. Palermo, D. Loebenberg, P. M. McNicholas. 2004. Posaconazole is a potent inhibitor of sterol 14 α -demethylation in yeasts and molds. *Antimicrob. Agents.Chemother.* 48:3690-3696.
63. Nagappan, V., S. Deresinski. 2007. Reviews of anti-infective agents: posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal agent. *Clin. Infect. Dis.* 45:1610-1617.
64. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. *Clin. Infect. Dis.* 24:235-247.

65. 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.
66. Nucci, M., E. Anaissie. 2001. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? Clin. Infect. Dis. 33:1959-1967.
67. Nucci, M., E. Anaissie. 2002. Should vascular catheters be removed from all patients with candidemia? An evidence-based review. Clin. Infect. Dis. 34:591-599.
68. Odds, F. C., M. G. Rinaldi, C. L. Cooper, Jr., A. Fothergill, L. Pasarell, M. R. McGinnis. 1997. Candida and Torulopsis: a blinded evaluation of use of pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts. J. Clin. Microbiol. 35:313-316.
69. Orozco, A. S., L. M. Higginbotham, C. A. Hitchcock, T. Parkinson, D. Falconer, A. S. Ibrahim, M. A. Ghannoum, S. G. Filler. 1998. Mechanism of fluconazole resistance in Candida krusei. Antimicrob. Agents Chemother. 42:2645-2649.
70. Ostrosky-Zeichner, L., J. H. Rex, P. G. Pappas, R. J. Hamill, R. A. Larsen, H. W. Horowitz, W. G. Powderly, N. Hyslop, C. A. Kauffman, J. Cleary, J. E. Mangino, J. Lee. 2003. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream Candida isolates in the United States. Antimicrob. Agents Chemother. 47:3149-3154.
71. Pappas, P. P., J. H. Rex, J. D. Sobel, S. G. Filler, W. E. Dismukes, T. J. Waals, J. E. Edwards. 2004. Guidelines for treatment of candidiasis. Clin. Infect. Dis. 38:161-189.
72. Perea, S., T. F. Patterson. 2002. Antifungal resistance in pathogenic fungi. Clin. Infect. Dis. 35:1073-1080.
73. Perfect, J. R., G. M. Cox, R. K. Dodge, W. A. Schell. 1996. In vitro and in vivo efficacies of the azole SCH56592 against Cryptococcus neoformans. Antimicrob. Agents Chemother. 40:1910-1913.
74. Pfaller, M. A., S.A. Messer, R.J. Hollis. 2001. *In vitro* activities of posaconazole (SCH 56592) compared with those of itraconazole and FLZ against 3,685 clinical isolates of Candida spp. and Cryptococcus neoformans. Antimicrob. Agents Chemother. 45:2862-2864.
75. Pfaller, M. A., D. J. Diekema, L. Boyken, S. A. Messer, S. Tendolkar, R. J. Hollis. 2003. Evaluation of the Etest and disk diffusion methods for determining susceptibilities of 235 bloodstream isolates of Candida glabrata to fluconazole and voriconazole. J. Clin. Microbiol. 41:1875-1880.

76. Pfaller, M. A., D. J. Diekema, S. A. Messer. 2003. *In vitro* activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *J. Clin. Microbiol.* 41:78-83.
77. Pfaller, M. A., L. Boyken, S. A. Messer, S. Tendolkar, R. J. Hollis, D. J. Diekema. 2004. Evaluation of etest method using Mueller-Hinton agar with glucose and methylene blue for determining amphotericin B MICs for 4,936 clinical isolates of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 42:4977-4979.
78. Pfaller, M. A., D. J. Diekema. 2004. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 42:4419-4431.
79. Pfaller, M. A., D. J. Diekema for the International Fungal Surveillance Participant Group. 2004. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin. Microbiol. Infect.* 10 (Suppl. 1):11-23.
80. Pfaller, M. A., D. J. Diekema, S. A. Messer, L. Boyken, R. J. Hollis, R. N. Jones. 2004. *In vitro* susceptibilities of rare *Candida* bloodstream isolates to ravuconazole and three comparative antifungal agents, species infrequently isolated from blood. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 48:101-105.
81. Pfaller, M. A., D. J. Sheehan, J. H. Rex. 2004. Determination of fungicidal activities against yeasts and moulds: lessons learned from bactericidal testing and need for standardization. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:268-280.
82. Pfaller, M. A., D. J. Diekema, J. H. Rex, A. Espinel-Ingroff, E. M. Johnson, D. Andes, V. Chaturvedi, M. A. Ghannoum, F. C. Odds, M. G. Rinaldi, D. J. Sheehan, P. Troke, T. J. Walsh, D. W. Warnock. 2006. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. *J. Clin. Microbiol.* 44:819-826.
83. Pinjon, E., D. Sullivan, I. Salkin, D. Shanley, D. Coleman. 1998. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 36:2093-2095.
84. Rangel-Frausto, M. S., T. Wiblin, H. M. Blumberg, L. Saiman, J. Patterson, M. Rinaldi, M. A. Pfaller, J. E. Edwards, Jr., W. Jarvis, J. Dawson, R.. P. Wenzel. 1999. National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. *Clin. Infect. Dis.* 29:253-258.

85. Rex, J. H., M. A. Pfaller, J. N. Galgiani, M. S. Bartlett, A. Espinel-Ingroff, M. A. Ghannoum, M. Lancaster, F. C. Odds, M. G. Rinaldi, T. J. Walsh, A. L. Barry for the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. *Clin. Infect. Dis.* 24:235-247.
86. Rex, J. H., M. A. Pfaller, T. J. Walsh, V. Chaturvedi, A. Espinel-Ingroff, M. A. Mahmoud, L. L. Gosey, F. C. Odds, M. G. Rinaldi, D. J. Sheehan, D. W. Warnock. 2001. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:643-658.
87. Romani, L., F. Bistoniand, P. Pucetti. 2003. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:338-343.
88. Rubio, M. C., I. R. de Ocáriz, J. Gil, R. Benito, A. Rezusta. 2005. Potential fungicidal effect of voriconazole against *Candida* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 25:264-267.
89. Sabatelli, F., R. Patel, P. A. Mann, C. A. Mendrick, C. C. Norris, R. Hare, D. Loebenberg, T. A. Black, P. M. McNicholas. 2006. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important mold and yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:2009-2015.
90. Samaranayake, Y. H., L. P. Samaranayake. 1994. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J. Med. Microbiol.* 41:295-310.
91. Samaranayake, Y. H., L. P. Samaranayake. 2001. Experimental Oral Candidiasis in Animal Models. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:398-429.
92. Sande, M.A., R. A. Brokks-Fournier, J. L. Gerberding. 1987. Efficacy of ciprofloxacin in animal models of infections: endocarditis, meningitis, and pneumonia. *Am. J. Med.* 82:63-66.
93. Sanglard, D., B. Hube, M. Monod, F. C. Odds, N. A. Gow. 1997. A triple deletion of secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect. Immun.* 65:3539-3546.
94. Schaller, M., H. C. Korting, W. Schafer, J. Bastert, W. Chen B. Hube. 1999. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol. Microbiol.* 34:169-180.

95. Serena, C., F. Gilgado, M. Mariné, J. Guarro. 2006. Efficacy of voriconazole in a guinea pig model of invasive trichosporonosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:2240-2243.
96. Sheehan, D. J., C. A. Hitchcock, C. M. Sibley. 1999. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:40-79.
97. Skiest, D.J., J. A. Vazquez, G. M. Anstead, J. R. Graybill, J. Reynes, D. Ward, R. Hare, N. Boparai, R. Isaacs. 2007. Posaconazole for the treatment of azole-refractory oropharyngeal and esophageal candidiasis in subjects with HIV infection. *Clin. Infect. Dis.* 44:607-614.
98. Sohnle, P. G., B.L. Hahn, M. D. Erdmann. 1996. Effect of fluconazole on viability of *Candida albicans* over extended periods of time. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2622-2625.
99. Soll, P. R. 1997. Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*. *Microbiology.* 143:279-288.
100. 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.
101. Spellberg, B., D. Johnston, Q. T. Phan, J. E. Edwards, Jr., S. W. French, A. S. Ibrahim, S. G. Filler. 2003. Parenchymal organ, and not splenic, immunity correlates with host survival during disseminated candidiasis. *Infect. Immun.* 71:5756-5764.
102. Stevens, D. A., M. Espiritu, R. Parmar. 2004. Paradoxical effect of caspofungin: reduced activity against *Candida albicans* at high drug concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3407-3411.
103. Stevens, D. A., T. C. White, D. S. Perlin, C. P. Selitrennikoff. 2005. Studies of the paradoxical effect of caspofungin at high drug concentrations. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 51:173-178.
104. Stone, E. A., H. B. Fung, H. L. Kirschenbaum. 2002. Caspofungin: an echinocandin antifungal agent. *Clin. Ther.* 24:351-377.
105. Sullivan, D., D. Coleman. 1997. *Candida dubliniensis*: an emerging opportunistic pathogen. *Curr. Top. Med. Mycol.* 8:15-25.
106. Sundstrom, P. 2002. Adhesins in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:353-357.
107. Szabó, B., L. Majoros, C. Miszt. 2000. Microbiological diagnosis of fungal infections, p. 198-213. In L. Maródi (ed.), *Emerging infectious diseases in Eastern-Central Europe*. Medicina Publishing House Co., Budapest, Hungary.

108. Szabó Zs., B. Tóth, M. Kovács, G. Kardos, A. Maráz, F. Rozgonyi, L. Majoros. 2008. Evaluation of the new MICRONAUT-Candida system for yeast identification against the API ID32C method. *J. Clin. Microbiol.* 46:1824-1825.
109. Tavanti, A., A. D. Davidson, N. A. Gow, M. C. Maiden, F. C. Odds. 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J. Clin. Microbiol.* 43:284-292.
110. Ullmann, A. J., J. H. Lipton, D. H. Vesole, P. Chandrasekar, A. Langston, S. R. Tarantolo, H. Greinix, W. Morais de Azevedo, V. Reddy, N. Boparai, L. Pedicone, H. Patino, S. Durrant. 2007. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.* 356:335-347.
111. Van Duin, D., W. Cleare, O. Zaragoza, A. Casadevall, J. D. Nosanchuk. 2004. Effects of voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2014-2020.
112. 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.
113. Vermes, A., H. J. Guchelaar, J. Dankert. 2000. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:171-179.
114. Warren, N. G., H. J. Shadomy. 1991. Yeasts of medical importance, p. 617-629. In A. Balows, W. J. Hausler, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
115. Watabe, E., T. Nakai, S. Matsumoto, F. Ikeda, K. Hatano. 2003. Killing activity of micafungin against *Aspergillus fumigatus* hyphae assessed by specific fluorescent staining for cell viability. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1995-1998.
116. White, T. C., K. A. Marr, R. A. Bowden. 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:382-402.
117. Witthuhn, F., D. Toubas, I. Béguinot, D. Aubert, C. Rouger, G. Remy, J. M. Pinon. 1999. Evaluation of the Fungitest kit by using strains from human immunodeficiency virus-infected patients: study of azole drug susceptibility. *J. Clin. Microbiol.* 37:864-866.
118. Xiao, L., V. Madison, A. S. Chau, D. Loebenberg, R. E. Palermo, P. M. McNicholas. 2004. Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450

14- α -sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:568-574.

10. 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**

11. 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. *J. Chemother.* 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

Összes IF: 18,753

12. Fontosabb poszterek, előadások

1. **Sóczó G.**, L. Majoros, G. Kardos. *In vitro* and *in vivo* studies with *Candida tropicalis* isolates exhibiting paradoxical growth in the presence high concentration of caspofungin. Ph. D. Hallgatók VI. Nemzetközi Konferenciája, Miskolc, 2007. aug.
2. **Sóczó G.**, G. Kardos., R. Gesztelyi, L. Majoros. *In vitro* and *in vivo* studies with *C. tropicalis* isolates, exhibiting paradoxical growth in the presence high concentration of caspofungin. 8th European Congress of Chemotherapy and Infection, Budapest, Hungary. Poster N° P-212. 26-28, October, 2006.
3. **Sóczó G.**, P. M. McNicholas, G. Kardos, E. Falusi, L. Majoros. Further studies on fungicidal activities of posaconazole. 46th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington D.C., Abstr. A-2151. 2006.
4. Majoros L., **G. Sóczó**, R. Gesztelyi, G. Kardos. Paradoxical growth in *C. tropicalis* isolates in the presence high concentration of caspofungin concentrations: *in vivo* implications and possible reversal by combination therapy. 3rd Trends in Medical Microbiology. Abstract N° O-16. 28-31, October, 2007. Turin, Italy.
5. Majoros L., Z. Szabó., E. Falusi, **G. Sóczó**, G. Kardos. Comparison of the performance of the new commercial yeast susceptibility panel MICRONAUT-AM to the standard method. 3rd Trends in Medical Microbiology. Poster N°: PO27. 28-31 October, 2007. Turin, Italy.
6. Kardos G., **G. Sóczó**, R. Gesztelyi, L. Majoros. Killing activity of amphotericin B against *Candida krusei* cannot be predicted by standard susceptibility testing: An *in vitro* comparison of methods. 8th European Congress of Chemotherapy and Infection, Budapest, Hungary, Poster N° P-213. 26-28, October, 2006.
7. Kardos G., **G. Sóczó**, P. M. McNicholas, E. Falusi, J. Hegedűs, L. Majoros. Time-kill studies show that posaconazole is fungicidal against some *Candida* species. The 16th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Paris, France. Poster N° P-0089. 25-29, June, 2006.