

**HUMÁN PATOGÉN *CANDIDA* FAJOK MOLEKULÁRIS KIMUTATÁSA ÉS  
JELLEMZÉSE**

**Ph.D. értekezés**

**Kocsubé Sándor**

**Témavezető: Dr. Varga János**



**Biológia Doktori Iskola**

**Szegedi Tudományegyetem**

**Természettudományi és Informatikai Kar**

**Mikrobiológiai Tanszék**

**2012**

**Szeged**

# Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés.....	5
2. Irodalmi áttekintés.....	7
2.1. A <i>Candida</i> fajok által okozott megbetegedések.....	7
2.2. A fertőzés kialakításában szerepet játszó potenciális virulencia faktorok .....	9
2.3. A <i>Candida parapsilosis</i> -ről.....	10
2.4. Antifungális szerek.....	12
2.4.1. Az azol típusú antifungális szerek .....	12
2.4.2. A polién típusú antifungális szerek.....	14
2.4.3. Egyéb antimikotikumok .....	15
2.4.4. A sztatínok és antifungális hatásuk .....	16
2.5. <i>Candida</i> fajok rezisztenciája a leggyakrabban alkalmazott antimikotikumokkal szemben.....	18
2.6. A klinikai azonosításban használt általános morfológiai, fiziológiai módszerek .....	19
2.7. Az azonosításban felhasználható molekuláris módszerek .....	20
3. Célkitűzések .....	22
4. Anyagok és módszerek.....	23
4.1. Táptalajok, tápoldatok és tenyésztési körülmények.....	25
4.2. A molekuláris munkák során alkalmazott módszerek.....	25
4.2.1. DNS-kivonás.....	25
4.2.2. A polimeráz láncreakció (PCR) .....	26
4.2.3. DNS-gélelektroforézis .....	29
4.2.4. A DNS-fragmentek tisztítása gélből .....	29
4.2.5. A DNS-fragmentek szekvenálása és a szekvenciák elemzése .....	30
4.3. A <i>C. parapsilosis</i> izolátumok fenotípus vizsgálatai során alkalmazott módszerek .....	30
4.4. Az <i>in vitro</i> antifungális érzékenységi vizsgálatok.....	31
4.4.1. A sztatínok törzsoldatainak készítése .....	31
4.4.2. Az antifungális szerek törzsoldatainak készítése.....	32
4.4.3. Az egyes antifungális szerek és a sztatínok minimális gátló koncentrációjának (MIC) meghatározása .....	32
4.4.4. Az antifungális szerek és sztatínok kölcsönhatásainak kimutatása checkerboard-titrálás segítségével .....	33
5. Eredmények és értékelés .....	35
5.1. Molekuláris kimutatási módszer kifejlesztése patogén <i>Candida</i> fajok kimutatására ...	35
5.1.1. <i>In silico</i> vizsgálatok.....	35
5.1.2. DNS-izoláló készletek tesztelése.....	36
5.1.3. A specifikus indítószekvenciák tervezése.....	36
5.1.4. Multiplex PCR kidolgozása .....	43
5.1.5. Az ellenőrző reakciók kifejlesztése .....	45
5.1.6. A reakciók érzékenységének tesztelése .....	47
5.2. A <i>Candida parapsilosis</i> izolátumok genetikai variabilitása .....	48
5.2.1. A kapott izolátumok elsődleges vizsgálata .....	48
5.2.2. RAPD-analízis .....	48

5.2.3. <i>A C. parapsilosis</i> izolátumok elkülönítése.....	49
5.2.4. ITS-szekvenciaelemzés .....	50
5.2.5. <i>A C. parapsilosis</i> izolátumok fenotipikus variabilitása.....	51
5.2.5.1. Szénhidrát-asszimilációs tesztek .....	51
5.2.5.2. Antifungális érzékenységi teszt.....	52
5.2.6. <i>A C. parapsilosis</i> gyakorisága a vizsgált kórházakban.....	52
5.2.7. Molekuláris kimutatás kifejlesztése a <i>C. parapsilosis sensu lato</i> csoportra .....	53
5.3. Antifungális szerek és sztatinok kölcsönhatásainak <i>in vitro</i> vizsgálata.....	56
5.3.1. A vizsgálatokat megelőző kutatások .....	56
5.3.2. A szerek minimális gátló koncentrációinak (MIC) megállapítása .....	57
5.3.3. Az antifungális szerek és sztatinok kölcsönhatásainak vizsgálata <i>C. parapsilosis</i> CBS 604 esetében .....	63
5.3.3.1. Az amfotericin B kombinálása sztatinokkal .....	63
5.3.3.2. A flukonazol kombinálása sztatinokkal .....	64
5.3.3.3. A grizeofulvin, itraconazol és ketokonazol kombinálása sztatinokkal .....	65
5.3.3.4. A nystatin kombinálása sztatinokkal .....	66
5.3.3.5. A terbinafin kombinálása sztatinokkal .....	66
5.3.3.6. A primycin kombinálása sztatinokkal.....	68
5.3.4. Az antifungális szerek és sztatinok kölcsönhatásainak vizsgálata <i>C. guilliermondii</i> CBS 566 esetében .....	70
5.3.4.1. Az amfotericin B kombinálása sztatinokkal .....	70
5.3.4.2. A flukonazol kombinálása sztatinokkal .....	71
5.3.4.3. A grizeofulvin kombinálása sztatinokkal .....	73
5.3.4.4. Az itraconazol kombinálása sztatinokkal .....	73
5.3.4.5. A ketokonazol kombinálása sztatinokkal .....	74
5.3.4.6. A nystatin kombinálása sztatinokkal .....	74
5.3.4.7. A terbinafin kombinálása sztatinokkal .....	75
5.3.4.8. A primycin kombinálása sztatinokkal.....	76
5.3.5. Az antifungális szerek és sztatinok kölcsönhatásainak vizsgálata <i>C. tropicalis</i> CBS 94 esetében .....	78
5.3.5.1. Az amfotericin B kombinálása sztatinokkal .....	78
5.3.5.2. A flukonazol kombinálása sztatinokkal .....	79
5.3.5.3. Az itraconazol kombinálása sztatinokkal .....	81
5.3.5.4. A grizeofulvin kombinálása sztatinokkal .....	83
5.3.5.5. A ketokonazol kombinálása sztatinokkal .....	83
5.3.5.6. A nystatin kombinálása sztatinokkal .....	85
5.3.5.7. A terbinafin kombinálása sztatinokkal .....	86
5.3.5.8. A primycin kombinálása sztatinokkal.....	87
6. Összefoglalás.....	89
7. Summary .....	94
8. Köszönetnyilvánítás .....	99
9. Idézett irodalom.....	100
10. Mellékletek.....	112

## Rövidítések jegyzéke

ADD	additív hatás
AMB	amfotericin B
ANT	antagonista hatás
ATOR	atorvasztatin
FLUK	flukonazol
FLUV	fluvasztatin
GRIS	grizeofulvin
ITRA	itrakonazol
KETO	ketokonazol
LOVA	lovasztatin
MOPS	3-N-morfolin-propánszulfonsav
NYS	nystatin
PDA	potatoe dextrose agar
PRAV	pravasztatin
PRI	primycin
ROSU	roszuvasztatin
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SZIM	szimvasztatin
SZIN	szinergista hatás
TER	terbinafin

## 1. Bevezetés

A *Candida* nemzetség közel 200 faja közül körülbelül 20 ismert, mint lehetséges humán patogén, élükön a *Candida albicans*-szal. A 80-as években a legtöbb megbetegedést a *C. albicans* okozta, azonban az 1990-es évektől napjainkig jelentős epidemiológiai változás állt be. A fertőzések túlnyomó többségéért jelenleg is a *C. albicans* tehető felelőssé, azonban a nem-albicans fajok (NAC, non-albicans *Candida*, nem-albicans *Candida*), mint a *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii* és *Candida lusitanae* okozta fertőzések számának jelentős emelkedését figyelték meg. A 90-es évekig két évtizeden keresztül a fertőzések mintegy 10-40%-át okozták NAC fajok, míg 1990-től 35-60%-ra emelkedett a nem-albicans fajok által okozott megbetegedések aránya (Krcmery és mtsai., 2002).

Az epidemiológiai váltás valószínűleg a flukonazol fokozott használatának köszönhető, melyekre a *C. krusei* elsődleges, a *C. glabrata* másodlagos rezisztenciát mutat (Segal, 2005). Kimutatták, hogy a felhasznált flukonazol mennyisége és a NAC fajok klinikai mintákban tapasztalt gyakorisága között szignifikáns az összefüggés (Bassetti és mtsai., 2006). Egyre elterjedtebb az antifungális szerek megelőzésként történő adagolása is, ami ugyan hatékonyan véd a *C. albicans* fertőzések ellen, de kevésbé a NAC fajok ellen (Krcmery és mtsai., 2002). A nem-albicans fajok virulenciája általában alacsonyabb, mint a *C. albicans*-é, mégis az általuk okozott megbetegedések mortalitása a gomba elsődleges, vagy másodlagos rezisztenciájából fakadóan akár a 70%-ot is elérheti (Gudlaugsson és mtsai., 2003). A váltás háttérében meghúzódhat még a sebészeti beavatkozások számának növekedése, a kemoterápiás szerek alkalmazásának emelkedése és a HIV-fertőzöttek arányának növekedése is. Ugyanakkor a diagnosztikai technikák fejlődése is hozzájárulhat a leírt nem-albicans fajok által okozott fertőzések számának emelkedéséhez.

Munkánk során célul tűztük ki egy olyan molekuláris módszer kidolgozását, mely alkalmas a legfontosabb nem-albicans *Candida* fajok pontos, gyors és költséghatékony kimutatására. Megvizsgáltuk az egyik legjelentősebb NAC faj, a *C. parapsilosis* magyarországi izolátumainak genetikai variabilitását és az általuk kiváltott fertőzések gyakoriságát. Új és megbízható molekuláris azonosítási módszert fejlesztettünk ki a fajkomplex nemrégiben leírt két új tagjára, a *C. orthopsilosis*-ra és a *C. metapsilosis*-ra. Megvizsgáltuk továbbá három felszíni fertőzésekből gyakran izolált faj, a *C. parapsilosis*, *C.*

*tropicalis* és *C. guilliermondii* antifungális szerekkel szembeni érzékenységét, és az antifungális szerek kölcsönhatásait különböző sztatinokkal.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A *Candida* fajok által okozott megbetegedések

Az emberi megbetegedéseket okozó *Candida* fajok oppurtunista patogének. Általában jelen vannak a gazdaszervezeten belül vagy annak környezetében (endogén vagy exogén eredetű kórokozó), de csak hajlamosító tényezők fennállása esetén váltanak ki fertőzést. Egészséges ember nyálkahártyáin is élnek *Candida* fajok, melyek csak bizonyos körülmények között válnak kórokozóvá, azaz okoznak enzimeik és patotoxinjaik révén sejtelhalást. Bőr- és nyálkahártya-fertőzéseket, valamint mély belszervi fertőzéseket okozhatnak. Más csoportosítás szerint szuperficiális, kután, szubkután és szisztémás kandidiázisra lehet felosztani a *Candida* fajok által okozott megbetegedéseket.

Ép immunrendszerű emberek esetében is ismert kórképek többek között a bőrfelszín, a szájnálkahártya és a körömszélek gyulladása. Az orális fertőzések kialakulásában számos tényező játszhat szerepet. Ilyenek például az újszülöttkor, rossz higiénias szokások, hosszan tartó antibiotikus kezelés (Samaranayake és mtsai., 2009). Súlyosabb és alapbetegségekkel társult, *Candida* által okozott megbetegedésekre példa a vesegyulladás, a tüdőgyulladás és a szívbelhártya-gyulladás. Egyes értelmezések szerint az invazív kandidiázis lehet lokalizált (egy szervre kiterjedő) és disszeminált (a vér- és nyirokerek révén más szerveket is megtámadó); míg mások szerint az invazív elnevezés a disszeminált formával egyenlő (de Hoog és mtsai., 2000).

A kockázati tényezők két csoportja a gazdaszervezettől függő (pl. cukorbetegség, HIV-fertőzés, neutropeniás állapot) és az egészségügyi ellátástól (pl. sebészeti beavatkozás) függő faktorok (Yapar és mtsai., 2006). A fertőzések számos helyen kialakulhatnak, jelentkezhetnek az urogenitális és légzőszervrendszerben, valamint a kórokozó fajok megtelepedhetnek a CVC (central venous catheter, központi vénás katéter) területén is (Dóczi és mtsai., 2002). Gyakori a sebészeti és az intenzív osztályokon, az onkológián, a transzplantált betegekben, a koraszülötteknél, az égési sérülteknél és az AIDS-betegeknél. A nyálkahártya *Candida* általi kolonizációja a betegség egyik rizikófaktor. Több tanulmány szerint ez az előfeltétele a későbbi mély, belszervi fertőzéseknek. A *C. albicans* okozta kandidémiák több mint 80%-ában megfigyelték a gomba béltraktusbeli megtelepedését is.

Ugyanakkor az exogén eredet mellett szól, hogy a *Candida* BSI (Bloodstream Infection, vérárami fertőzés) gyakran összekapcsolható intravaszkuláris eszközök használatával és parenterális (gyomor-bélrendszert megkerülő) táplálással. Az ECMM (European Confederation of Medical Mycology) felmérésében a BSI-ben szenvedő betegek 79,6%-ánál jelen volt intravaszkuláris katéter, melyről az eltávolítás után az esetek 65,7%-ában kitenyészthető volt a fertőzést kiváltó *Candida* faj (Tortorano és mtsai., 2006)

Kandidémiáról pozitív hemokultúra esetében beszélünk, azaz a *Candida* faj vérből történő kimutatása esetén. A véráramba jutva a kórokozó képes eljutni különböző testtájakra, súlyos mikózist okozva. A kandidémiák kialakulásában szerepet játszhatnak különböző betegségek, mint például HIV-fertőzés, leukémia, daganatos megbetegedések és a neutropénia. Az ilyen típusú fertőzések legnagyobb részét *C. albicans* izolátumok okozzák, a nem-albicans fajok közül a leggyakrabban azonosított fajok a *C. parapsilosis*, a *C. glabrata*, *C. tropicalis* és a *C. krusei* (Trofa és mtsai., 2008, Malani és mtsai., 2005, Kontoyiannis és mtsai., 2001, Abbas és mtsai., 2000).

A szívbelhártya gyulladását is okozhatják *Candida* fajok, de az esetek száma az összes gombaeredetű fertőzéshez viszonyítva nem túl gyakori. A szakirodalmi adatok alapján a betegséget leggyakrabban kiváltó *C. albicans* után a második legelterjedtebb faj a *C. parapsilosis* (Baddley és mtsai., 2008). A betegség kialakulásában szerepet játszhat az orvosi beavatkozás, antibiotikumos kezelés és a legyengült immunrendszer. A *Candida* fajok által okozott szívbelhártya-gyulladásos esetek mortalitási aránya magas.

Okozhatnak agyhártyagyulladást is, mely esetek túlnyomó részéért a *C. albicans* tehető felelőssé. Az elmúlt években azonban megemelkedett a *C. parapsilosis* izolátumok okozta fertőzések száma - elsősorban újszülöttek esetében (Trofa és mtsai., 2008) - és a *C. tropicalis* által okozott esetek aránya is (Henao és Vagner, 2011). A betegség mortalitása 10-30%, a kezelést általában flucitozinnal és amfotericin B-vel végzik.

A hashártyagyulladást okozó *Candida* fajok közül szintén a *C. albicans* számít a leggyakoribbnak. A betegség igen magas mortalitással rendelkezik, a hajlamosító tényezők között elsősorban a dialízis és a betegség kialakulását megelőző, bakteriális eredetű hashártyagyulladás antibiotikumos kezelése áll (Trofa és mtsai., 2008). Az esetek kisebb hányadéért a *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* és *C. krusei* fajok tehetők felelőssé (Montravers és mtsai., 2006).

Ritka esetben súlyos ízületi gyulladást is okozhatnak *Candida* fajok. Elsősorban daganatos, HIV-fertőzött, illetve ízületi műtéten átesett betegek esetében alakulhat ki, de Kawanabe és munkatársai (2003) beszámoltak olyan esetről, amelyet nem előzött meg orvosi



beavatkozás, illetve egyéb hajlamosító betegség. A szakirodalomban viszonylag kevés adat található ilyen típusú invazív fertőzésről, de a legtöbb megbetegedést *C. albicans* kapcsán írták le (Lee és mtsai., 2011). A nem-albicans fajok közül a *C. parapsilosis*, *C. krusei* és *C. tropicalis* a legtöbbet említett faj (Lu és mtsai., 2012, Kim és mtsai., 2011, Trofa és mtsai., 2008). Az antifungális kezelés általában hónapokig is eltarthat.

A szaruhártya fertőzését (keratitisz) és a szem belső részeinek gombás gyulladását (endoftalmitisz) a trópusi területeken elsősorban baktériumok, illetve fonalgombák okozzák. A fejlődő országokban azonban egyre inkább előtérbe kerültek a *Candida* fajok okozta megbetegedések. A kórkép kialakításában szerepet játszhat fungémia, a szaruhártya előzetes sérülése, helytelen higiénias szokások kontaktlencsét viselőknél, illetve szemműtétek is. A legelterjedtebb patogén ezekben az esetben is a *C. albicans* (Klotz és mtsai., 2000, Sun és mtsai., 2007), de számos esetben *C. tropicalis* és *C. parapsilosis* izolátumok is okozhatják a szem gombás megbetegedését (Vanzzini Zago és mtsai., 2012).

A külső- és középfül gyulladását szintén okozhatják *Candida* fajok, de az esetek száma az ízületi gyulladásokéhoz hasonlóan alacsony. A szakirodalmi adatok alapján a legelterjedtebb faj a *C. albicans* és a *C. parapsilosis*. A betegség lefolyása általában nem súlyos, a klotrimazollal történő kezelés az esetek 95-100%-ában teljes gyógyuláshoz vezetett (Munguia és Daniel, 2008).

## **2.2. A fertőzés kialakításában szerepet játszó potenciális virulencia faktorok**

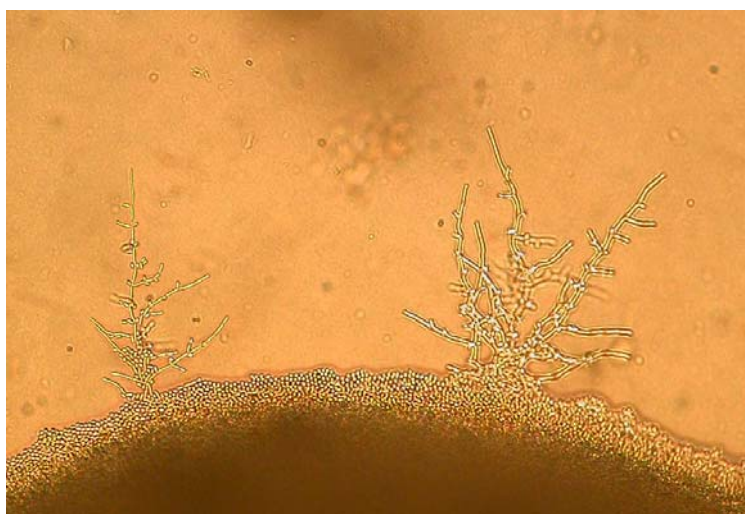
A patogenitás alapfeltételei közé tartozik a gazdaszöveten történő megtapadás képessége. A megtapadást elősegíti a sejt felszínének hidrofobicitása, emellett számos kórokozó képes polimer felületeken biofilmet kialakítani, köztük számos *Candida* faj is. Az adott felszínhez tapadva extracelluláris polimerekből egy mátrixot hoznak létre, melynek legfőbb klinikai vonatkozása, hogy alkotó sejtjei kevésbé reagálnak az antifungális kezelésre (Kojic és Darouiche, 2004). A szövethez történő adhézióhoz és az invázióhoz szükség van hidrolitikus enzimek termelésére is. Lin és munkatársai (1995) a vaginitist okozó törzsekben jelentős hidrolitikus enzimtermelődést tapasztaltak. A szekretált aszpartát proteázoknak (Sap) köszönhetően az élesztő képes a nyálkahártyát borító sejteket károsítani és az immunrendszer védekezésben szerepet játszó fehérjeit emésztetni (Naglik és mtsai., 2003). A foszfolipázok termelése feltételezhetően szintén hozzájárul a fertőzés kialakításához, mivel ezek az enzimek alkalmasak membránok károsítására, így elősegítik a gazdaszervezetbe való bejutást. A

lipázoknak szerepe lehet a tápanyagfelvételben a gazdaszervezet lipidjeinek emésztésén keresztül, illetve segíthetik a megtapadást és a versenyt a humán mikrobióta lízisén keresztül (Trofa és mtsai., 2008).

Az élesztőforma és a hifás megjelenés közötti váltás, a dimorfizmus is jelentős szerepet játszik, mint patogenitási faktor. A fenotipikus váltásnak jelentős szerepe van a felülethez stabilan tapadó biofilm létrehozásában. A hifás növekedésre képtelen forma csak a bazális réteget képes kialakítani, az élesztőalakban mutáns csak a külső réteget tudja megformálni (Kojic és Darouiche, 2004). A fenotípus váltása, a fenotipikus „switching” a gomba különböző anatómiai helyekhez történő adaptációjában játszik szerepet. Emellett a gomba képes a gazda immunrendszerének modulálására is (Segal, 2005).

### 2.3. A *Candida parapsilosis*-ről

A fajt Ashford írta le 1928-ban Puerto Rico-ban egy diarrheás betegből származó izolátum alapján. *Monilia parapsilosis*-nak nevezte el, megkülönböztetve a *Monilia psilosis*-től, ami jelenleg a *C. albicans* nevet viseli. Telepe krémszínű-sárgás, fényes, többnyire sima vagy részben, esetleg teljesen ráncos. Mikroszkópiusan a sok pseudomicélium jellemzi. A pseudomicéliumot alkotó hosszúkás sejtek elágazó láncokat alkotnak „karácsonyfaszerű” elrendezésben (**1. Ábra**), a hifa csúcsa felé a laterális ágak folyamatosan rövidülnek (de Hoog és mtsai., 2000).



**1. Ábra.** *C. parapsilosis* pseudomicélium malátás táptalajon tenyésztve (a szerző felvétele).

Humán kommenzalista, a normál mikrobióta tagja, gyakori epiteliális szöveteken és nyálkahártyák felületén (Fundyga és mtsai., 2004). Az egyetlen NAC faj, melynek előfordulása 1990 óta folyamatosan növekvő tendenciát mutat. Néhány ázsiai országban a *C. parapsilosis* a második leggyakoribb kandidémiát kiváltó faj (Pfaller és mtsai., 2008). Leírták, mint perikarditist (szívburokgyulladást), endokarditist, endoftalmitist (a szem belső burkainak gyulladása), pankreatitist (hasnyálmirigy gyulladása) és artritist (ízületi gyulladás) okozó élesztőt (de Hoog és mtsai., 2000). A *C. parapsilosis* által okozott fertőzések mortalitási aránya alacsonyabb a *C. albicans*-fertőzések kapcsán tapasztaltaknál, azonban az utóbbi évek vizsgálatai alapján ez is emelkedni látszik, elsősorban újszülöttek esetében (van Asbeck és mtsai., 2009).

A *C. parapsilosis* genetikai heterogenitását több módszerrel kimutatták. DNS-reasszociációs vizsgálatok mutattak elsőként rá a fajon belüli csoportok jelenlétére (Nakase és mtsai., 1979). A véletlenszerűen amplifikált polimorf DNS-analízis (random amplified polymorphic DNA, RAPD) technika alkalmazásával szintén az elsők között különítették el a fiziológiailag homogénnek tűnő *C. parapsilosis* három alcsoportját (Lehmann és mtsai., 1992). Lin és munkatársai (1995) több szempontból vizsgálták a faj genotipikus heterogenitását. Az izoenzim-elektroforézis kimutatta a 3 különálló csoport meglétét. Az ITS2 (internal transcribed spacer, köztes átíródó elválasztó régió) szinte teljesen azonos, az 5,8S rRNS-t kódoló gén megegyező nukleotidsorrendű a 3 alcsoportban. Az ITS1-szakasz összehasonlító szekvenciaelemzése során azonban már eltérés mutatkozott. Ez alapján az I-es csoport a II-es csoporthoz 87,7% -ban, a III-as csoporthoz pedig 82,1%-ban hasonlít, míg a II-es és III-as csoport 84,5%-ban megegyezők. Tavanti és munkatársai (2005) MLST (multilocus sequence typing) vizsgálataik során olyan variábilis géneket kerestek, melyek segítségével az eltérő földrajzi és anatómiai helyekről származó *C. parapsilosis* izolátumok megkülönböztethetők. Eredeti céljukat nem érték el, mert a minták nagy többségét kitevő I-es csoport vizsgált génjei alacsony szintű polimorfizmust mutattak és ezért nem voltak alkalmasak MLST vizsgálatra. Ugyanakkor olyan mértékű szekvenciabeli eltérést találtak a három alcsoport között, mely külön fajokra jellemző. 11 gén amplifikálását tűzték ki célul, az indítószekvenciákat a *C. parapsilosis* génjei alapján tervezték. Hét esetben a II-es és a III-as csoport izolátumainál egyáltalán nem keletkezett termék, vagy nem a várt méretű fragmentet kapták. Ebből is az alcsoportok genomjainak számottevő eltérésére lehet következtetni. Az előbbi megfigyelésekre hivatkozva javasolták a *C. parapsilosis* név megtartását az I-es csoportra, a II-es csoport helyett a *C. orthopsilosis*, a III-as helyett pedig a *C. metapsilosis* elnevezés bevezetését. Az új fajok leírásában kiemelték, hogy azok egymástól csak

molekuláris biológiai módszerekkel különíthetők el, kizárólag morfológiai alapon ez nem lehetséges.

Az előbbi tanulmánnyal egyidőben brazíliai és japán minták 5,8S rRNS- és ITS-régióinak szekvenciaelemzése során beszámoltak a tágabb értelemben vett *C. parapsilosis* fajon belül egy negyedik csoport meglétéről is (Iida és mtsai., 2005). Négy brazíliai izolátum ITS-szekvenciái alapján külön filogenetikai csoportot alkotott. A nagy riboszómális DNS-régió D1 és D2 doménjeinek elemzése támogatta a IV. csoport létjogosultságát. Összességében a vizsgálat megerősítette a *C. parapsilosis* és a rokon fajok ITS-régióinak nagymértékű diverzitását.

## 2.4. Antifungális szerek

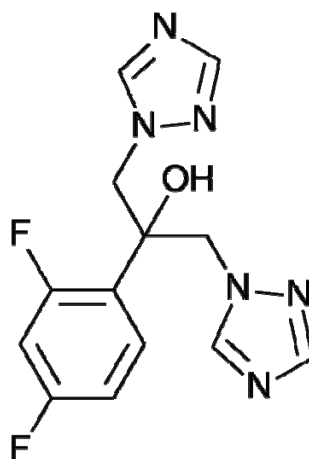
A *Candida* fajok okozta fertőzések kezelésére napjainkban is számos antifungális szert fejlesztenek ki, azonban a klinikai kezelések során leggyakrabban alkalmazott gombaellenes készítmények továbbra is az azol és polién típusú vegyületek maradtak. Az antifungális szerek hatásukat általában a szterol-bioszintézis egyes enzimeinek gátlásán, a sejtfal és a membrán közvetlen károsításán, illetve a DNS-szintézis gátlásán keresztül fejtik ki.

### 2.4.1. Az azol típusú antifungális szerek

Az azol típusú vegyületek kifejlesztése a 60-as évek végén történt. Két csoportra lehet osztani őket, az imidazolokra (ketokonazol, mikonazol, klotrimazol) és a triazolokra (flukonazol, itraconazol, vorikonazol). Mindkét csoport egy citokróm P450 típusú enzim gátlásán keresztül fejt ki hatását, de a támadási pont különbözik.

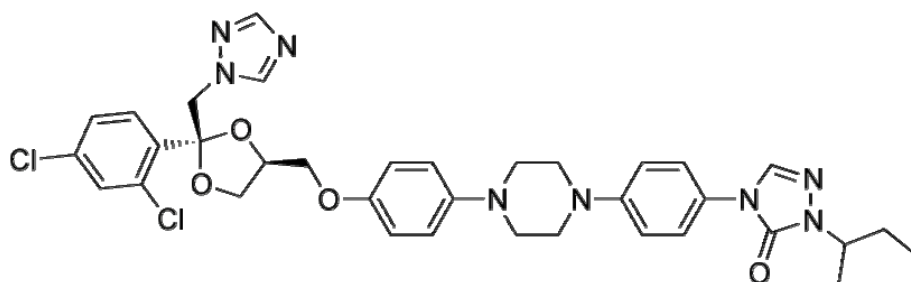
A **flukonazol** egy mesterséges bisz-triazol típusú vegyület, melyet az 1990-es években fejlesztettek ki (**2. Ábra**). Hatását a lanoszterol-demetiláz enzim gátlásán keresztül fejt ki. Ez az enzim egy citokróm P450 típusú enzim, mely a lanoszterol ergoszterollá történő átalakításáért felelős. Az ergoszterol-bioszintézis gátlása a lanoszterol 14 $\alpha$  pozícióban történő demetilációjának gátlásán keresztül valósul meg. A 14 $\alpha$ -szterol demetiláz aktív centruma tartalmaz egy hem-csoportot, melyhez kötődik a flukonazol, megakadályozva az átalakítást (Odds és mtsai., 2003). Az ergoszterol-bioszintézis akadályozása miatt egyéb szterolok épülnek be a membránba, jelentősen megváltoztatva annak fluiditását, permeabilitását és a membránkötött fehérjék aktivitását. Másodlagos hatásként a sejtfal bioszintézisben szerepet játszó fehérjék nem tudnak kötődni a membránhoz, melynek következtében a sejtfal

integritása megváltozik. Habár a flukonazol elsősorban fungisztatikus, ezek a hatások együttesen végül a gombasejtek pusztulásához vezetnek. A flukonazol az emlősök citokróm P450-enzimeihez is képes kötődni és ezáltal a lanoszterol koleszterollá történő átalakítást gátolni (Casalnuovo és mtsai., 2004). A terápás célokra használt koncentrációban azonban jóval nagyobb arányban kötődik a gomba P450 demetilázához, mint az emlős enzimekhez, azonban kismértékű májkárosító hatásával számolni kell. A flukonazolt gyakran alkalmazzák felületi és szisztémás gombafertőzések kezelésében, orális és intravénás úton is jól alkalmazható, továbbá toxicitása az amfotericin B-nél alacsonyabb. A szervezetben gyorsan szétterjed, plazmaeliminációs féleletideje megközelítőleg 30 óra (Huijgens és mtsai., 1999). A flukonazollal szemben általában a legérzékenyebb *Candida* fajok a *C. albicans*, *C. tropicalis* és a *C. parapsilosis*.



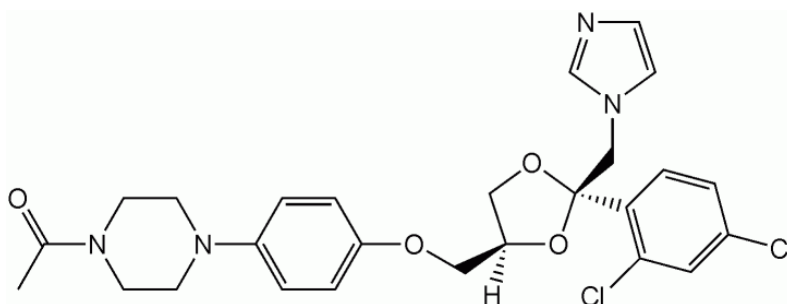
**2. Ábra.** A flukonazol szerkezeti képlete.

Az **itrakonazol** egy lipofil szintetikus triazol származék, melyet 1984-ben fejlesztettek ki, majd 1991-ben engedélyeztek (**3. Ábra**). Antifungális hatása a flukonazolhoz hasonlóan az ergoszterol-bioszintézis gátlásán keresztül valósul meg, azonban szélesebb körben használható. Számos flukonazol-rezisztens *Candida* izolátum ellen sikeresen alkalmazható. Az emlős citokróm P450-hez csak igen kis affinitással kötődik. Adagolható kapszulázott formulában, illetve intravénásan is. Szájon keresztül történő felhasználása esetén szükséges az alkalmazást megelőzően táplálkozni, mivel a gyomor pH-jának csökkenése, és a bevitt táplálék zsírtartalma jelentősen megnövelik a szer felszívódásának mértékét (Zimmermann és mtsai., 1994). Zsírdékony tulajdonsága miatt hatékonyan lehet alkalmazni a bőr és a körmök (Rongioletti és mtsai., 1992) gombás fertőzései ellen, illetve mélymikózisok kezelése során.



3. Ábra. Az itrakonazol szerkezeti képlete.

A **ketokonazol** egy szintetikus imidazol-dioxolán-származék, mely széles spektrumú aktivitással rendelkezik élesztők és bőrgombák ellen (4. Ábra). Hatását szintén a  $14\alpha$ -szterol demetiláz enzim gátlásán keresztül fejti ki. A ketokonazol volt az első orálisan alkalmazott azol, de manapság használata háttérbe szorult májkárosító és a humán szteroid hormon bioszintézist gátló hatásai miatt (Como és Dismukes, 1994). Az itrakonazolhoz hasonlóan ez a vegyület is lipofil tulajdonsággal rendelkezik, melynek következtében felhalmozódik a zsírszövetben. Zsírdékony tulajdonságának köszönhetően orális alkalmazás esetén a gyomor savassága jelentősen befolyásolja a felszívódást (Chin és mtsai., 1995). Carlson és munkatársai (1983) által végzett kutatások alapján az optimális felszívódás pH 3 alatt következik be, míg pH 5,5 felett a szer oldhatósága jelentős mértékben lecsökken, így a felszívódása is.

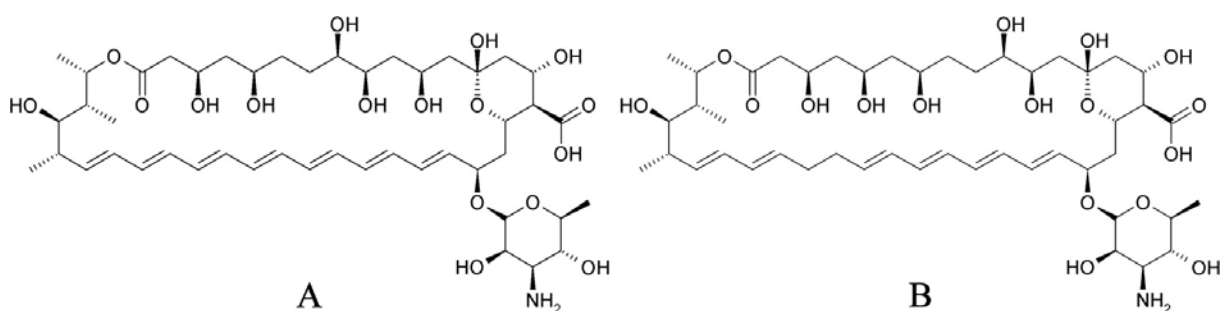


4. Ábra. A ketokonazol szerkezeti képlete.

#### 2.4.2. A polién típusú antifungális szerek

Hatásukat az ergoszterolhoz való irreverzibilis kötődésen keresztül fejtik ki. A membránban megkötődve csatornát alakítanak ki, melyen keresztül kálium és magnézium

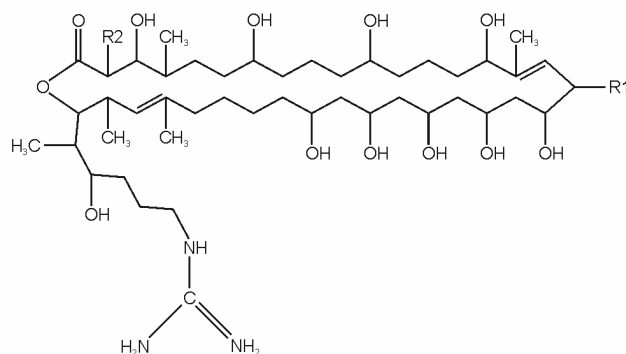
ionok, cukrok és egyéb metabolitok áramlanak ki a citoplazmából. A polién típusú makrolid antimikotikumoknak több mint 100 vegyülete ismert, de ezek közül az **amfotericin B**, a **nystatin (5. Ábra)** és a **natamicin** a legelterjedtebben használt antifungális szerek. Az amfotericin B és a nystatin az emberi szervezetre is toxikus hatású, melyet lipid-asszociált változatok bevezetésével sikerült jelentősen csökkenteni (Carrillo-Muñoz és mtsai., 2006). Az *ERG3* és az *ERG11* génekben bekövetkező mutációk hatására rezisztencia alakulhat ki *C. albicans*, *C. glabrata* és *C. tropicalis* esetében (Vanden Bossche és mtsai., 2003).



**5. Ábra.** Az amfotericin B (A) és a nystatin (B) szerkezeti képlete.

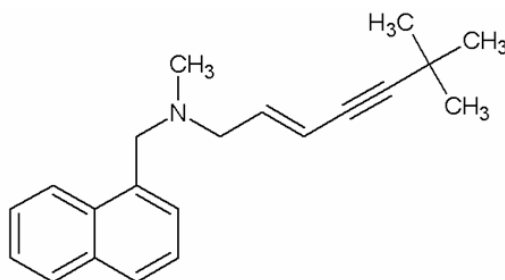
#### 2.4.3. Egyéb antimikotikumok

A **primycin** egy nem polién típusú makrolid lakton komplex, melyet 1954-ben fedezett fel Vályi-Nagy Tibor (**6. Ábra**). A komplex tagjai három fő csoportra (A, B és C) oszthatóak a funkciós csoportok alapján. A fő komponens az A1, mely a komplex 50%-át adja. Elsősorban Gram-negatív baktériumok ellen hatásos, azonban magasabb koncentrációban fonalgombák és élesztők ellen is sikerrel alkalmazható. Antimikrobiális hatását feltehetően a membránok ionáteresztő képességének fokozásán keresztül fejt ki (Horváth és mtsai., 1979). Állatkísérletekben jelentős toxikusságát mutatták ki, ezért csak felszíni készítményekben való alkalmazása engedélyezett (Vályi-Nagy és mtsai., 1954)



6. Ábra. A primycin általános szekezeti képlete.

Az **allilaminok** az ergoszterol-bioszintézis út egyik enzimének, a szkvalén-epoxidáznak gátlásán keresztül fejtik ki antifungális hatásukat. Az emlős koleszterol-bioszintézisben szerepet játszó enzimeket csak kis mértékben gátolják, ezért az emberi szervezetre nézve toxicitásuk minimális. Az egyik leggyakrabban használt allilamin a **terbinafin** (7. Ábra). Számos élesztő esetében kevésbé hatékony, de a *C. parapsilosis* izolátumok általában érzékenyek a szerrel szemben. *C. albicans* esetében kimutatták, hogy terbinafinnal történő kezelés hatására megemelkedik az *ERG1* gén expressziója, ami csökkent érzékenységhez vezet. A *C. glabrata*, *C. krusei* és *C. tropicalis* izolátumok általában rezisztensek a terbinafinnal szemben (Perea és mtsai., 2002b, Ryder és mtsai., 1998)



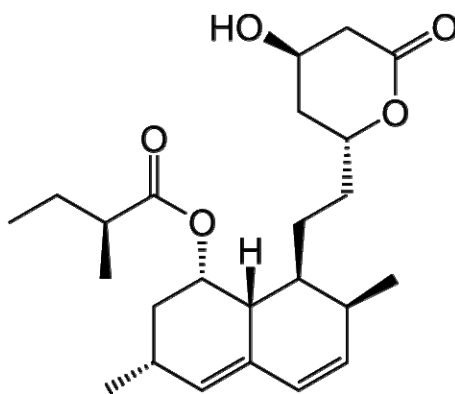
7. Ábra. A terbinafin szerkezeti képlete.

#### 2.4.4. A sztatínok és antifungális hatásuk

A sztatínok a leggyakrabban alkalmazott koleszterinszint-csökkentő gyógyszerek, hatásuk a 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-KoA) reduktáz enzim szelektív gátlásán alapul, ezáltal csökkentik a szterolszintézist, vagyis csökkentik a vér összkoleszterinjét. Az első leírt sztatín a mevasztatin volt, melyet *Penicillium citrinum* szűrletéből



Egyes publikációk már felvetették a sztatinok és különböző antimikotikumok együttes alkalmazásának lehetőségét. Chin és munkatársai (1997) vizsgálták a fluvasztatin, a pravasztatin, a lovasztatin és a szimvasztatin hatását *C. albicans*, *C. parapsilosis* és *C. tropicalis* törzsek esetében. A sztatinok önmagukban nem, vagy csak csekély antifungális aktivitással rendelkeztek, azonban a fluvasztatin-flukonazol és fluvasztatin-itrakonazol kombinációk által okozott növekedésgátlás esetében szinergista és additív kölcsönhatásokat mutattak ki. A kombinációkban alkalmazott fluvasztatin-koncentráció azonban jóval a vérben maximálisan elérhető szérumszint felett volt, így ez a gyakorlatban nem kivitelezhető. Nash és munkatársai (2002) a fluvasztatin/flukonazol és a pravasztatin/flukonazol kombinációk hatását vizsgálták *C. albicans* esetében, de nem tapasztaltak kölcsönhatásokat, mivel ezekben a kísérletekben a fluvasztatint és a pravasztatint a klinikailag szérumban elérhető koncentrációkban alkalmazták (0,448 µg/ml és 0,055 µg/ml).



17

## 2.5. *Candida* fajok rezisztenciája a leggyakrabban alkalmazott antimikotikumokkal szemben

Ha a klinikai kezelések során bebizonyosodik, hogy a beteg valamely *Candida* faj által fertőzött, akkor a kezelést elsősorban amfotericin B és/vagy flukonazol használatával kezdik. *Candida* törzsek esetében igen fontos a pontos, fajszintű azonosítás, mivel a különböző fajok igen eltérő módon érzékenyek a különböző antifungális szerekkel szemben. A helyes terápiás szer megválasztását nehezíti, hogy számos *Candida* faj eredendően érzéketlen vagy képes igen gyorsan rezisztenciát kialakítani a leggyakrabban alkalmazott azolokkal és poliénekkal, elsősorban az amfotericin B-vel és a flukonazzal szemben.

Flukonazzal szemben általában érzékenyek mondhatóak a *Candida* fajok, de *C. albicans* esetében rezisztencia alakulhat ki a szerrel szemben egy flukonazol efflux-pumpát kódoló gén (*MDR1*) túlműködése által, vagy a  $14\alpha$ -szterol demetiláz (*ERG11*) génben történő mutáció, illetve a gén túlműködésének következtében (Odds, 2004). Egyéb efflux-pumpát kódoló gének (*CDR1*, *CDR2*) túlműködése szintén megnövekedett rezisztenciát okozhat flukonazzal és egyéb triazolokkal szemben (Pfaller és mtsai., 2006a). Az *ERG11* gén túlműködésének következtében fellépő rezisztenciát *Candida dubliniensis* kapcsán is leírták (Perea és mtsai., 2002c). Az antifungális érzékenységi adatok alapján elmondható, hogy a *C. dubliniensis* izolátumok általában kevésbé érzékenyek flukonazzal, itrakonazzal és ketokonazzal szemben, mint a *C. albicans* (Gutiérrez és mtsai., 2002). Az *ERG11* gén mutációja és a *CDR1*, *CDR2* gének túlműködésének következtében szintén rezisztencia alakulhat ki *C. glabrata* esetében is (Sanguinetti és mtsai., 2005). A *C. krusei* érzékenysége a flukonazzal szemben jóval alacsonyabb, mint a szuszceptibilis *C. albicans* izolátumoké, melynek hátterében a mikroorganizmus  $14\alpha$ -szterol demetilázának eredendően csökkent érzékenysége áll (Orozco és mtsai., 1998), azonban érzékenyek mutatkozik egyéb triazolokkal szemben. A *C. guilliermondi* izolátumok általában kevésbé érzékenyek flukonazzal és itrakonazzal szemben, mint a *C. albicans* és pán-azol-rezisztens törzset is izoláltak már (Savini és mtsai., 2010b). Az utóbbi években jelentősebben megemelkedett a flukonazol-rezisztens *C. tropicalis* izolátumok száma is, de a rezisztencia pontos hátterét nem sikerült még feltárni (Kothavade és mtsai., 2010). A *C. lusitaniae* izolátumok általában érzékenyek mutatkoznak azolokkal szemben (Favel és mtsai., 2004, Hawkins és Baddoura, 2003). A *C. parapsilosis* törzsek az esetleírások túlnyomó részében érzékenyek bizonyulnak flukonazzal szemben, azonban a szakirodalom beszámol rezisztens törzsek jelenlétéről is (Deshpande 2003, Sarvikivi és mtsai., 2005, Ostrosky-Zeichner és mtsai., 2003).

Az amfotericin B-vel szemben általában érzékenynek mutatkoznak a *Candida* fajok, de rezisztens izolátumokról is beszámol a szakirodalom. Használata ellen szól dóziszfüggő vesekárosító hatása, ami azonban az esetek többségében visszafordítható (Chen és mtsai., 2007). A *C. tropicalis* esetében csak néhány leírás található, mely megbízhatóan bizonyítja az izolátum AMB rezisztenciáját (Chai és mtsai., 2010). Az amfotericin B-re eredendően rezisztens *C. lusitaniae* izolátumokról számos adat található a szakirodalomban, azonban Hawkins és munkatársai (2003) az irodalmi adatokat összegyűjtve megállapították, hogy a leírásokban szereplő rezisztens törzsek csak 21,7% százalékát képezik az összes vizsgált izolátumnak. A *C. albicans*, *C. dubliniensis* és *C. parapsilosis* izolátumok általában érzékenyebbek, mint a *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. inconspicua* és *C. krusei* törzsek (Savini és mtsai., 2010a, Majoros és mtsai., 2005, van Asbeck és mtsai., 2009), a rezisztencia megjelenése ezeknél a törzseknél általában ritka (Perea és Patterson, 2002, Trofa és mtsai., 2008).

## **2.6. A klinikai azonosításban használt általános morfológiai, fiziológiai módszerek**

A humán patogén gombák klinikai mintákból történő fajsztípus azonosításának első lépése a minta tenyésztése és tisztítása, mely általában klóramfenikolt tartalmazó Sabouraud-agar lemezekon történik. A tenyészeteket ezután főként fenotipikus módszerekkel, illetve a kereskedelmi forgalomban elérhető tesztek segítségével azonosítják (Liguori és mtsai., 2010). A csíratömlőteszt felhasználható a *C. albicans* és *C. dubliniensis* azonosítására, azonban nem alkalmas a két faj megkülönböztetésére. A teszt során az izolátumokat főtálcis borjúszerűmbe, vagy friss humán szérumbe tenyésztik 37°C-on 2,5-3 órán keresztül, majd mikroszkópos vizsgálattal azonosítják a csíratömlő jelenlétét (Joshi és mtsai., 1975).

Gyakran használt azonosítási módszer a kromogén táptalajok alkalmazása, azonban ezek a termékek általában nem alkalmasak az összes fontos patogén megbízható azonosítására. A CHROMALBICANS (Bioline) csak a *C. albicans* izolátumok elkülönítésére alkalmas, melyek kék telepeket képeznek a táptalaj felületén, míg az egyéb *Candida* fajok nem festődnek. A Brilliance™ *Candida* Agar (Oxoid) használatával lehetőség nyílik a *C. krusei* és a *C. tropicalis* elkülönítésére, azonban nem alkalmas a *C. albicans* és a *C. dubliniensis* elkülönítésére, mert mindkét faj zöld telepet képez a táptalaj felületén. Szintén nem alkalmas a *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis* és a *C. lusitaniae* megbízható elkülönítésére, mivel ezek a fajok hasonló, barnás telepeket képeznek a táptalajon. A

CandiSelect™ 4 (BIO-RAD) elsősorban a *C. albicans* izolátumok elkülönítésére alkalmas. Alkalmazásával lehetőség nyílik *C. tropicalis*, *C. glabrata* és *C. krusei* izolátumok azonosítására is, de a megbízható, fajsztíű besorolás nem lehetséges, mivel mindhárom faj türkizkék telepeket képez, apróbb különbségekkel a telepfelszín morfológiájában. A CHROMagar™ Candida (CHROMAgar) táptalaj használatával a *C. albicans* izolátumok zöld, a *C. tropicalis* izolátumok kék, míg a *C. krusei* izolátumok rózsaszínű telepeket képeznek. Más *Candida* fajok elkülönítésére nem alkalmas a készítmény.

A kereskedelmi forgalomban elérhető szénhidrát-asszimilációs tesztek (API ID 32C, API 20C) általában alkalmasak a pontos azonosításra, de az eredmények nem minden esetben megbízhatóak. Szabó és munkatársai (2008b) összehasonlítva az API ID32C asszimilációs tesztet a Micronaut-Candida (Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim, Germany) tesztel megállapították, hogy az ID32C 18 izolátumot helytelenül azonosított, míg a Micronaut-Candida teszt segítségével lehetséges volt mind a 264 vizsgált törzs pontos azonosítása.

## 2.7. Az azonosításban felhasználható molekuláris módszerek

A restrikciós fragmenthossz-polimorfizmuson (restriction fragment length polymorphism, RFLP) alapuló technikák alkalmasnak bizonyultak számos faj azonosítására, azonban időigényesek és nem minden esetben reprodukálhatók. Scherer és Stevens (1987) három restrikciós endonuklázt vizsgálva (*EcoRI*, *HindIII* és *BamHI*) megállapították, hogy az *EcoRI* enzim felhasználásával előállított genomiális DNS-profilok alkalmasnak bizonyultak *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis* (*C. kefyr*) és *C. parapsilosis* izolátumok elkülönítésére. Magee és munkatársai (1987) a riboszómális DNS-régiót emésztették *EcoRI* restrikciós enzimmel és sikeresen különítették el három *Candida* fajt, a *C. albicans*-t, a *C. tropicalis*-t és a *C. guilliermondii*-t. Az ITS1 és ITS4 indítószekvenciákkal felszaporított riboszómális DNS-régió *MspI* endonukleázzal emésztve lehetővé tette további három faj (*C. glabrata*, *C. krusei* és *C. parapsilosis*) azonosítását (Mirhendi és mtsai., 2006). Mason és munkatársai (1987) a *C. albicans* aktint kódoló DNS-szakaszát próbaként felhasználva, tizenkilenc izolátum *HindIII*-mal és *EcoRI*-el emésztett genomiális DNS-ének hibridizációjával sikeresen különítették el a *C. albicans/stellatoidea*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* és *C. glabrata* fajokat. A lanoszterol-demetiláz enzimet kódoló gén egy szakaszának RFLP-vizsgálata szintén alkalmasnak bizonyult hét (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei* és *C. parapsilosis*)

*Candida* faj elkülönítésére (Morace és mtsai., 1997), de a pontos azonosításhoz szükség volt a szakaszok több enzimmel (*HinCII*, *NsiI*, *Sau3A*) történő emésztésére.

Az utóbbi években egyre több polimeráz láncreakción (polymerase chain reaction, PCR) alapuló módszert alkalmaznak *Candida* fajok elkülönítésére. A RAPD-analízis néhány esetben alkalmas lehet a pontos fajsztíű azonosításra. Az OPE-18 indítószekvencia felhasználásával Baires-Varguez és munkatársai (2007) sikeresen azonosítottak hét fajt (*C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. pelliculosa*, *C. albicans*, *C. krusei* és *C. lusitaniae*). Steffan és munkatársai (1997) összehasonlították a RAPD-technika felhasználásával és CHROMagar alkalmazásával kapott adatokat és 98% feletti egyezést tapasztaltak. A Thanos és munkatársai (1996) által elvégzett kísérletben az AP3 dekamer alkalmasnak bizonyult számos klinikai szempontból fontos izolátum elkülönítésére. A RAPD-technika azonban általában nem bizonyul megbízható módszernek, mivel az eredmény nehezen ismételhető meg, és az egy fajba tartozó izolátumok között jelentős különbségek lehetnek.

Az PCR-alapú azonosítások során a legtöbb esetben a riboszómális DNS-szakaszt használják fel, mivel kiváló feloldóképességgel rendelkezik és felszaporítása univerzális indítószekvenciákkal lehetséges. Az univerzális indítószekvenciák felhasználásával kapott DNS-szakaszok mérete a különböző *Candida* fajok esetében eltérő lehet, de ez önmagában nem elégséges az azonosításhoz, mert a méretkülönbségek sok esetben elenyészőek. Ez a régió azonban alkalmas specifikus indítószekvenciák tervezésére, melyek használatával a pontos fajsztíű azonosítás lehetővé válik (Nazzal és mtsai., 2005, Mannarelli és Kurtzman, 1998). A klinikai diagnosztizálásban használt molekuláris módszerek közül legintenzívebben kutatott terület a multiplex PCR-technikák kidolgozása (Lau és Lee, 2008, Tarini és mtsai., 2010 Kanbe és mtsai., 2002, Lim és mtsai., 2002). Carvalho és munkatársai (2007) a riboszómális régió ITS1 és ITS2 variábilis szakaszát felhasználva tervezett egy multiplex reakciót nyolc *Candida* faj kimutatására, melyben egy élesztőkre specifikus indítószekvenciapárt kombináltak patogén *Candida* fajokra specifikus indítószekvenciákkal.

### 3. Célkitűzések

A nem-albicans fajok által okozott fertőzések számának emelkedése, és az egyre sűrűbben megjelenő antifungális szerekkel szembeni rezisztencia igen fontossá teszi a *Candida* fajok pontos, fajszintű azonosítását. Mindezek alapján a következő célokat fogalmaztuk meg:

1. Egy hatékony, a klinikai diagnosztizálásban is könnyen felhasználható PCR-alapú fajazonosítási módszer kidolgozása a *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* és *C. lusitaniae* fajokra.
2. A *C. parapsilosis* magyarországi klinikai izolátumainak genetikai jellemzése és antifungális szerekkel szembeni érzékenységük vizsgálata.
3. Antifungális szerek és különböző sztatinek kölcsönhatásainak vizsgálata *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* és *C. guilliermondi* izolátumok esetében.

## 4. Anyagok és módszerek

**1. Táblázat.** A vizsgálatok során felhasznált *Candida* izolátumok.

Fajnév	Az izolátumok kódja, törzsgyűjteményes száma	Az izolálás adatai, egyéb adatok
<i>C. albicans</i>	ATCC 90028	-
<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	-
<i>C. dubliniensis</i>	CBS 7987	szájüreg, HIV-fertőzött beteg
<i>C. glabrata</i>	CBS 138	széklet
<i>C. guilliermondii</i>	CBS 566	köpet
<i>C. inconspicua</i>	CBS 180	köpet
<i>C. kefyr</i>	SZMC 1511	Pécs
<i>C. krusei</i>	CBS 573	köpet, bronchitiszes beteg
<i>C. lipolytica</i>	CBS 6124	kukorica-feldolgozó
<i>C. lusitaniae</i>	CBS 6936	citrus kivonat
<i>C. metapsilosis</i>	CP 5	köpet, Pisa
<i>C. metapsilosis</i>	CP 43	tüdő, Pisa
<i>C. metapsilosis</i>	CP 61	köröm, Pisa
<i>C. metapsilosis</i>	CP 231	köröm, Pisa
<i>C. metapsilosis</i>	CP 261	köröm, Pisa
<i>C. metapsilosis</i>	CP 271	széklet, Pisa
<i>C. metapsilosis</i>	CP 92	széklet, Pisa
<i>C. metapsilosis</i>	CP 376	széklet, Pisa
<i>C. norvegensis</i>	SZMC 198	-
<i>C. norvegica</i>	CBS 4239	köpet
<i>C. orthopsilosis</i>	CP 25	köröm, Pisa
<i>C. orthopsilosis</i>	CP 47	bőr, Pisa
<i>C. orthopsilosis</i>	CP 85	katéter, L' Aquila
<i>C. orthopsilosis</i>	CP 296	bőr, Pisa
<i>C. orthopsilosis</i>	MCO 471	-

<i>C. orthopsilosis</i>	CP 331	köpet, Pisa
<i>C. orthopsilosis</i>	LT 289	Németország
<i>C. orthopsilosis</i>	LT 308	Németország
<i>C. orthopsilosis</i>	NRZ 1114	Németország
<i>C. orthopsilosis</i>	NRZ 1467	Németország
<i>C. orthopsilosis</i>	NRZ 1566	Németország
<i>C. orthopsilosis</i>	MCO 456	-
<i>C. parapsilosis</i>	CBS 604	széklet
<i>C. parapsilosis</i>	12821	vér, Debrecen
<i>C. parapsilosis</i>	3929	vér, Debrecen
<i>C. parapsilosis</i>	1188/1	vér, Debrecen
<i>C. parapsilosis</i>	6769	vér, Debrecen
<i>C. parapsilosis</i>	11811	vér, Debrecen
<i>C. parapsilosis</i>	5312	vér, Debrecen
<i>C. parapsilosis</i>	5308	vér, Debrecen
<i>C. parapsilosis</i>	25329	vér, Debrecen
<i>C. parapsilosis</i>	Bp57	nyelőcső, Pécs
<i>C. parapsilosis</i>	Bp73	gyomor, Pécs
<i>C. parapsilosis</i>	Bp42	vér, Pécs
<i>C. parapsilosis</i>	Bp101	vér, Pécs
<i>C. parapsilosis</i>	Bp113	vér, Pécs
<i>C. parapsilosis</i>	Bp59	köröm, Pécs
<i>C. parapsilosis</i>	Bp75	köröm, Pécs
<i>C. parapsilosis</i>	Bp46	vér, Pécs
<i>C. parapsilosis</i>	Bp54	kézköröm, Pécs
<i>C. parapsilosis</i>	Bp3	köröm, Pécs
<i>C. parapsilosis</i>	Bp90	köpet, Pécs
<i>C. parapsilosis</i>	Bp94	vér, Pécs
<i>C. parapsilosis</i>	5311	vér, Debrecen
<i>C. parapsilosis</i>	5068/1	vér, Debrecen
<i>C. parapsilosis</i>	Bp47	vér, Pécs
<i>C. parapsilosis</i>	Bp39	klinikai minta, Pécs
<i>C. parapsilosis</i>	Bp63	vér, Pécs



<i>C. parapsilosis</i>	Bp86	vér, Pécs
<i>C. parapsilosis</i>	640	Szeged
<i>C. parapsilosis</i>	74181/2002	Szeged
<i>C. parapsilosis</i>	26655/2006	Szeged
<i>C. parapsilosis</i>	46958/2006	Szeged
<i>C. parapsilosis</i>	47458/2006	Szeged
<i>C. parapsilosis</i>	49683/2006	Szeged
<i>C. parapsilosis</i>	13210	tályog, Debrecen
<i>C. parapsilosis</i>	16478	seb, Debrecen
<i>C. parapsilosis</i>	17466	kanül, Debrecen
<i>C. parapsilosis</i>	18249	vizelet, Debrecen
<i>C. pulcherrima</i>	CBS 5833	-
<i>C. tropicalis</i>	CBS 94	bronchitiszes beteg
<i>C. zeylanoides</i>	CBS 619	blasztomikózis

#### 4.1. Táptalajok, tápoldatok és tenyésztési körülmények

A vizsgálatok során felhasznált izolátumokat malátás táptalajon (0,5% malátakivonat, 0,5% élesztőkivonat, 0,5% glükóz, 3% agar) tartottuk fenn 4°C-on.

A DNS-kivonásokhoz az élesztőket YPD-tápoldatban (0,5% élesztőkivonat, 0,5% pepton, 1% glükóz), 25°C-on, 2 napon keresztül, 150 rpm-en rázatva neveltük.

Az *in vitro* érzékenységi vizsgálatokhoz a törzseket burgonyás táptalajon (PDA, Sigma-Aldrich) 1 napig tenyésztettük. A vizsgálatok során RPMI 1640 tápoldatot (RPMI 1640 Medium L-glutaminnal, nátrium-bikarbonát nélkül, Sigma-Aldrich) használtunk.

#### 4.2. A molekuláris munkák során alkalmazott módszerek

##### 4.2.1. DNS-kivonás

A DNS-kivonáshoz a Epicentre Biotechnologies® MasterPure™ Yeast DNA Purification készletet használtuk. A kivonást a gyártó utasítási alapján végeztük el. A

kicsapást követően a DNS-t 50µl steril bidesztillált vízben oldottuk fel, majd a mintákat felhasználásig -20°C-on tároltuk.

#### 4.2.2. A polimeráz láncreakció (PCR)

A *C. parapsilosis* izolátumok vizsgálata során és az rDNS-alapú kimutatási reakciók megtervezéséhez az alábbi molekuláris módszereket alkalmaztuk:

A Luo és Mitchell (2002) által tervezett, a tágabb értelemben vett *C. parapsilosis* csoportra specifikus indítószekvenciák és reakciókörülmények:

CPA<sub>3</sub>: 5'-GCCAGAGATTAAACTCAACCAA-3'

CPA<sub>2</sub>: 5'-CCTATCCATTAGTTTATACTCCGC-3'

1. 96°C – 5 perc
2. 94°C – 30 másodperc
3. 58°C – 30 másodperc
4. 72°C – 30 másodperc → 2. lépés 40 ciklusban
5. 72°C – 30 másodperc

A Pontieri és munkatársai (2001) által tervezett, a *C. parapsilosis* I-es csoportjára specifikus indítószekvenciák és a reakciókörülmények:

Fw1: 5'-GTGAGAGATGTTTGTAATTGCGAGAACC-3'

Rv1: 5'-GCATTATTCGGACGTTCAACCCG-3'

1. 94°C – 3 perc
2. 94°C – 1 perc
3. 65°C – 1 perc
4. 72°C – 30 másodperc → 2. lépés 25 ciklusban
5. 72°C – 7 perc

Az rDNS-génkomplex felsokszorosítására használt indítószekvenciák (White és mtsi, 1990) és reakciókörülmények:

NS1: 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'

NS2: 5'-GGCTGCTGGCACCAGACTTGC-3'

ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

1. 94°C – 1 perc

2. 94°C – 30 másodperc

3. 48°C – 40 másodperc

4. 72°C – 90 másodperc → 2. lépés 35 ciklusban

5. 72°C – 3 perc

A *Candida*-specifikus ellenőrző reakciók megtervezéséhez felhasznált nagy affinitású vas-permeáz (FTR1) (Nyilasi és mtsai., 2008) és foszfolipáz D (PLD) fehérjéket kódoló génszakaszok felsokszorosítása során felhasznált indítószekvenciák:

FTR-A: 5'-GGTCTAGAGARGAYATHTGGGARGG-3'

FTR-B: 5'-GGCTCGAGCCANCCNARDATNGCRRTRAA-3'

pID1: 5'-ATHCAYGAYTGGTGGHT-3'

pID2: 5'-ACRTCRTGCCANGGCAT-3'

A *C. metapsilosis* izolátumok tipizálásához felhasznált transzlációs elongációs faktor 1 alfa (TEF1- $\alpha$ ) fehérjéket kódoló génszakaszok felsokszorosítása során felhasznált indítószekvenciák:

EF1a-frw: 5'-GTGAATTCGARGCYGGWATMTCYAAG-3'

EF1-2212R: 5'-CCRACRGCRACRGTYTGTCTCAT-3'

A reakció ciklusai mindhárom génszakasz esetében az alábbiak voltak:

1. 94°C – 3 perc
2. 94°C – 1 perc
3. 55°C – 1 perc
4. 72°C – 2 perc → 2. lépés 35 ciklusban
5. 72°C – 3 perc

Minden reakcióhoz az alábbi összetételű elegyet használtuk:

- 4 µl 1 mM-os dNTP oldat (Sigma-Aldrich)
- 4-4 µl (1 pmol/µl) indítószekvencia
- 2 µl 10X Double-Taq<sup>TM</sup> puffer (ZenonBio)
- 3 µl 25 mM-os MgCl<sub>2</sub> (ZenonBio)
- 2 µl steril bidesztillált víz
- 0,2 µl Double-Taq<sup>TM</sup> DNS-polimeráz (ZenonBio)
- 1 µl templát DNS

A RAPD-PCR vizsgálatokhoz az Operon random indítószekvencia-sorozat (Operon Technologies) és az UBC (University of British Columbia) indítószekvenciák közül a következő dekamereket használtuk:

OPC-02: 5'-GTGAGGCGTC-3'	OPD-12: 5'-CACCGTATCC-3'
OPC-05: 5'-GATGACCGCC-3'	OPE-17: 5'-CTACTGCCGT-3'
OPC-07: 5'-GTCCCGACGA-3'	OPG-07: 5'-GAACCTGCGG-3'
OPC-09: 5'-CTCACCGTCC-3'	OPG-19: 5'-GTCAGGGCAA-3'
OPC-12: 5'-TGTCATCCCC-3'	OPH-18: 5'-GAATCGGCCA-3'
OPC-14: 5'-TGCGTGCTTG-3'	OPK-04: 5'-CCGCCCAAAC-3'
OPC-16: 5'-CACACTCCAG-3'	OPM-18: 5'-CACCATCCGT-3'
OPC-18: 5'-TGAGTGGGTG-3'	OPR-15: 5'-GGACAACGAG-3'
OPC-20: 5'-ACTTCGCCAC-3'	OPW-17: 5'-ACCGGCTTGT-3'
UBC 8: 5'-CCTGGCGGTA-3'	UBC 66: 5'-GAGGGCGTGA-3'
UBC 18: 5'-GGGCCGTTTA-3'	

A reakció körülményei:

1. 94°C – 2 perc
2. 94°C – 30 másodperc
3. 36°C – 35 másodperc
4. 72°C – 90 másodperc → 2. lépés 35 ciklusban
5. 72°C – 3 perc

A RAPD-PCR elegy:

- 4 µl 1 mM-os dNTP oldat (Sigma-Aldrich)
- 5,6 µl (1 pmol/µl) indítószekvencia
- 2 µl 10X Double-Taq™ puffer (ZenonBio)
- 1,2 µl 25 mM-os MgCl<sub>2</sub> (ZenonBio)
- 6,2 µl steril bidesztillált víz
- 0,2 µl Double-Taq™ DNS-polimeráz (ZenonBio)
- 1 µl templát DNS

#### **4.2.3. DNS-gélelektroforézis**

A PCR-termékeket TAE-puffer (4,84 g Tris, 1,14 ml 96%-os ecetsav; 2 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA 1000 ml desztillált vízben, pH 8,0) használatával, 1%-os agaróz (Reanal) gélben futtattuk 5-10 V/cm feszültség mellett horizontális gélelektroforetikus készülék segítségével. A termékek láthatóvá tételéhez 0,5 µl (10mg/ml) etídium-bromidot (Sigma-Aldrich) használtunk 100 ml gélhez. Futtatás után a DNS-sávokat 254 nm-es UV-átvilágítással tettük láthatóvá. A fotókat UVP géldokumentációs rendszerrel készítettük.

#### **4.2.4. A DNS-fragmentek tisztítása gélből**

A termékek tisztításához a Sigma-Aldrich® GenElute™ Minus EtBr Spin Column készletét használtuk. A gélből steril pengével kivágtuk a fragmenteket, és az oszlopba helyeztük azokat. A fragmentek tisztítását a protokoll utasításainak megfelelően hajtottuk

vége. A vizes fázisból 96%-os etanollal kicsaptuk a DNS-t, majd a beszárítást (Savant SpeedVac® DNA 110) követően a mintákat 10 µl steril bidesztillált vízben vettük fel, és a szekvenálásig hűtőszekrényben tároltuk -20°C-on.

#### **4.2.5. A DNS-fragmentek szekvenálása és a szekvenciák elemzése**

A tisztított DNS-fragmentek nukleotidsorrendjének meghatározását a Szegedi Biológiai Központ (SZBK) Szekvenáló Laboratóriumának munkatársai végezték ABI 373A DNS automata szekvenáló készülékkel. A szekvenogramok kiértékeléséhez a BioEdit (© Tom Hall) és az NCBI honlapján található Basic Local Alingment Search Tool (BLAST, [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) programokat használtuk. Az illesztéseket a ClustalX (Thompson és mtsai., 1997) program használatával és manuális kiigazítással készítettük. A szekvenciák evolúciós távolságát a DNADIST program Kimura-formulájával számoltuk ki. A filogenetikai fák a PHYLIP csomag NEIGHBOR programjával készültek, a neighbor-joining módszer használatával. A támogatottsági értékeket 1000 replika alkalmazásával a SEQBOOT, DNADIST, NEIGHBOR és CONSENSE programokkal számoltuk ki (Felsenstein, 1995). A RAPD-adatokat vizuálisan értékeltük ki. Azokat a sávokat használtuk fel az analízis során, melyek megfelelő erősségűnek bizonyultak és a független ismétlések során is jelen voltak. A sávok jelenlétén, illetve hiányán alapuló bináris mátrixból a PhylTools program segítségével távolság mátrixot hoztunk létre. Az adatokon alapuló neighbor-joining fát a PHYLIP programcsomag NEIGHBOR programjával végeztük.

A Dr. Gácsér Attila által rendelkezésünkre bocsátott *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* és *C. orthopsilosis* szekvenciák analízise során az illesztéseket szintén a ClustalX programmal végeztük, a filogenetikai analízist a MEGA 5 (Tamura és mtsai., 2011) programcsomag felhasználásával Maximum Parszimónia analízis alkalmazásával hajtottuk végre. A támogatottsági értékeket 1000 replika használatával számoltuk ki.

#### **4.3. A *C. parapsilosis* izolátumok fenotípus vizsgálatai során alkalmazott módszerek**

A debreceni és pécsi klinikai *C. parapsilosis* izolátumok szénhidrát-asszimilációs vizsgálatait az API 20 C AUX V. 3.0 (BioMérieux) készlet felhasználásával végeztük. A kísérleteket a gyártó előírásai alapján hajtottuk végre. A mintákat vizuálisan értékeltük ki. A

fajok azonosítása a növekedés mértékén alapuló numerikus profil felhasználásával történt amit a készlethez mellékelt adatbázis felhasználásával hajtottunk végre. Az izolátumok antifungális érzékenységi vizsgálatait Etest 95 (AB Biodisk) tesztcsíkok használatával végeztük. Az izolátumokból 0,5 MacFarland turbiditású szuszpenziót készítettünk és Casitone agar médiumra szélesztettük. A csészéket 24-48 órán át 30°C-on inkubáltuk, és a minimális gátló koncentráció (minimal inhibitory concentration, MIC) értékeket a kioltási zóna leolvasásával állapítottuk meg. A leolvasott adatokat a NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) adatai alapján értékeltük.

#### **4.4. Az *in vitro* antifungális érzékenységi vizsgálatok**

##### **4.4.1. A sztatinok törzsoldatainak készítése**

A lovasztatin (Mevacor, MSD) és a szimvasztatin (Vasilip, Egis) esetében 40 mg hatóanyagot 1 ml metanolban (Spektrum-3D) oldottunk fel, majd lúgos hidrolízissel a prodrog formát aktív, nyílt láncú savformává alakítottuk át, ami 15% etanol (Spektrum-3D) és 0,25% (w/v) NaOH (Reanal) tartalmú oldatban történő inkubálást jelent 60°C-on 60 percig. Fluvasztatin (Lescol, Novartis) törzsoldat elkészítésekor szintén 40 mg hatóanyagot oldottunk fel 1 ml metanolban. Az atorvasztatin (Atorvox, Richter) törzsoldat elkészítéséhez 20 mg hatóanyagot oldottunk fel 1 ml metanolban. A roszuvasztatin (Crestor, MSD) esetében 10 mg hatóanyagot oldottunk fel szintén 1 ml metanolban. A pravasztatin törzsoldat elkészítéséhez 25 mg hatóanyagot 1 ml desztillált vízben oldottunk fel. Az elkészített törzsoldatokat tovább hígítottuk metanollal, illetve a pravasztatin esetében desztillált vízzel, és az így kapott 2,5 mg/ml-es sztatin törzsoldatokat használtuk a hígítási sor elkészítéséhez. A törzsoldatokat mindig frissen készítettük, tárolásuk 4°C-on, maximum 1 hétig történt. Lovasztatin és szimvasztatin esetében a lúgos hidrolízist minden esetben közvetlenül az érzékenységi vizsgálatok megkezdése előtt végeztük.

#### **4.4.2. Az antifungális szerek törzsoldatainak készítése**

Az amfotericin B (Sigma-Aldrich) 250 µg/ml-es gyári törzsoldatát -20°C-os hőmérsékleten, fénytől védett csomagolásban tároltuk. A ketokonazol (Sigma-Aldrich) esetében 5 mg/ml-es törzsoldatot készítettünk dimetilszulfoxidban (DMSO, Sigma-Aldrich) oldva, majd ezt tovább hígítottuk szintén DMSO-val 1,6 mg/ml-es koncentrációra. Az itrakonazol (Sigma-Aldrich) esetében 5 mg/ml-es törzsoldatot készítettünk DMSO-ban oldva, majd ezt hígítottuk 0,8 mg/ml-es koncentrációra. A flukonazol (Sigma-Aldrich) törzsoldatát 10 mg/ml-es koncentrációban készítettük el dimetilformamidban (DMF, Reanal) oldva, majd 6,4 mg/ml-re hígítottuk DMF-fel. A grizeofulvin (Sigma-Aldrich) esetében 10 mg/ml-es törzsoldatot állítottunk elő DMF-ben oldva, majd ezt hígítottuk DMF-fel 6,4 mg/ml koncentrációra. A nystatin (Sigma-Aldrich) esetében 5 mg/ml-es törzsoldatot készítettünk DMSO-ban oldva, majd ezt hígítottuk szintén DMSO-ban 1,6 mg/ml-es koncentrációra. A terbinafin (LGC Promochem) esetében DMSO-ban 5 mg/ml-es törzsoldatot készítettünk, majd tovább hígítottuk DMSO-val 0,8 mg/ml-es koncentrációra. A primycin (Pannonpharma) esetében 10 mg/ml-es törzsoldatot készítettünk DMSO-ban oldva, majd 6,4 mg/ml-es koncentrációra hígítottuk DMSO-val. A törzsoldatokat legfeljebb 6 hónapon keresztül tároltuk -20°C hőmérsékleten.

#### **4.4.3. Az egyes antifungális szerek és a sztatínok minimális gátló koncentrációjának (MIC) meghatározása**

A vizsgálatokba bevont *Candida* fajok antimikotikum-érzékenységének meghatározására a nemzetközi szabványban kidolgozott mikrodilúciós módszert (NCCLS M27-A, NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards) alkalmaztuk. A MIC-értékek megállapításához a fajokat 96 lyukú mikrotiter lemezekben (Costar 3599) tenyésztettük. Standard tenyésztőközegként az RPMI 1640 tápoldatot (Sigma-Aldrich-R4130) alkalmaztuk, melynek pH-ját 7-re állítottuk be 0,165 M MOPS (Sigma-Aldrich) pufferrel. Az 1 napos PDA ferde agaron inkubált tenyészetekből desztillált vízben szuszpenziót készítettünk, majd Bürker-kamra segítségével megszámoltuk a sejteket. A szuszpenziót úgy hígítottuk tovább RPMI-ben, hogy a vizsgálatok során a mikrotiter lemezen minden lyukba  $1 \times 10^3$  sejt kerüljön. Az alkalmazott sztatínok koncentrációja a mikrotiter lemezen minden



esetben 128 µg/ml-től 0,25 µg/ml-ig csökkenő felező hígítási sor volt. A flukonazol, a grizeofulvin és a primicin esetében 64 µg/ml-től 0,125 µg/ml-ig csökkenő felező hígítási sort alkalmaztunk. A ketokonazolt, az amfotericin B-t és a nystatin-t 16-0,03 µg/ml felező hígítási sorban, az itraconazolt és a terbinafint 8-0,015 µg/ml felező hígítási sorban alkalmaztuk. A lemezen minden lyukba 100 µl RPMI-ben elkészített sejtszuspenzió és 100 µl szintén RPMI-ben elkészített felező hígítási sorban alkalmazott sztatin, illetve antifungális szer került felvitelre. A növekedési kontroll 100 µl RPMI-tápoldatot és 100 µl RPMI-tápoldatban elkészített sejtszuspenziót tartalmazott. A tenyésztés 35°C-on történt 2 napig. A tenyészetek abszorbanciáját mikrotiterlap-leolvasó (Jupiter HD, ASYS Hitech GmbH) segítségével 620 nm hullámhosszúságú fény abszorbanciájával határoztuk meg. A vizsgálatokat 3 párhuzamosban végeztük, a gátlási százalékot a kontroll növekedéséhez (100%) viszonyítva számoltuk ki.

#### ***4.4.4. Az antifungális szerek és sztatinek kölcsönhatásainak kimutatása checkerboard-titrálás segítségével***

A kölcsönhatások vizsgálatai során a fajokat 96 lyukú mikrotiter lemezek (Costar 3599) tenyésztettük. Standard tenyésztőközegként 0,165 M MOPS-pufferrel pH=7-re beállított RPMI 1640 tápoldatot használtunk. Az 1 napos PDA ferde agaron inkubált tenyészetekből desztillált vízben szuszpenziót készítettünk, majd a Bürker-kamra segítségével elvégzett sejtszámolás után a szuszpenziót úgy hígítottuk tovább RPMI-ben, hogy a vizsgálatok során a mikrotiter lemezen minden lyukba  $1 \times 10^3$  sejt kerüljön. Az alkalmazott sztatinek koncentrációja a mikrotiter lemezen minden esetben 25 µg/ml-től 0,39 µg/ml-ig csökkenő felező hígítási sor volt. A flukonazol, a grizeofulvin és a primicin esetében 64 µg/ml-től 0,125 µg/ml-ig csökkenő felező hígítási sort alkalmaztunk. A ketokonazol, az amfotericin B és a nystatin esetében 16 µg/ml-től 0,03 µg/ml-ig csökkenő felező hígítási sort, míg az itraconazol és a terbinafin esetében 8 µg/ml-től 0,015 µg/ml-ig csökkenő felező hígítási sort alkalmaztunk.

A lemezen minden lyukba 100 µl RPMI-ben elkészített sejtszuspenzió, 50-50 µl szintén RPMI-ben felező hígítási sorban elkészített sztatin és antifungális szer és sztatin került felvitelre. A növekedési kontroll 100 µl RPMI-tápoldatot és 100 µl RPMI-tápoldatban elkészített sejtszuspenziót tartalmazott. A 35°C-on két napig tartó tenyésztést követően a tenyészetek abszorbanciáját mikrotiterlap-leolvasó (Jupiter HD, ASYS Hitech GmbH)

segítségével 620 nm hullámhosszúságú fény abszorbanciájával határoztuk meg. A vizsgálatokat 3 párhuzamosban végeztük, a gátlási százalékot a kezeletlen kontroll növekedéséhez (100%) viszonyítva számoltuk ki.

A sztatinok és az antifungális szerek közötti interakciók (IR) kiszámítása az Abbott formula (Gisi, 1996) alapján történt:  $I_e = X + Y - (XY/100)$ .  $I_e$  a várt gátlási százalék,  $X$  a sztatín önmagában okozott gátlási százaléka,  $Y$  pedig az antifungális szer önmagában okozott gátlási százaléka.  $I_0$  a két szer együttes alkalmazásakor megfigyelt gátlási százalék. A kölcsönhatások mértékét (IR) az  $IR = I_0/I_e$  képlet használatával kaptuk meg. Ha az IR-érték 0,5 és 1,5 között volt, akkor a kölcsönhatás additívnek bizonyult. Ha 1,5-nél nagyobb volt az IR-érték, akkor szinergizmust, a 0,5-nél alacsonyabb IR-érték esetén pedig antagonizmust állapítottunk meg (Moreno és mtsai., 2003). A dolgozatban a 3 párhuzamos kísérlet átlag gátlási százalékainak felhasználásával számoltuk ki az IR-értékeket. A szórásokat a párhuzamosokban mért gátlási százalékokból számítottuk.

## 5. Eredmények és értékelés

### 5.1. Molekuláris kimutatási módszer kifejlesztése patogén *Candida* fajok kimutatására

A szakirodalomban a *Candida* fajok pontos kimutatására legtöbbször használt génszakasz a riboszómális DNS-génkomplex. Az rDNS-komplexben találhatóak igen konzervatív szakaszok (26S, 5.8S, 18S és 5S rRNS gének), melyeket variábilis nem kódoló régiók, ITS (Internal Transcribed Spacer) és IGS (Intergenic Spacer) választanak el egymástól. Az rRNS-gének konzerváltak voltak lehetővé tette univerzális indítószekvenciák tervezését, melyek segítségével a gombák ITS-régiói felszaporíthatóak. Az rDNS-génkomplex élesztőkben mintegy 150 kópiában található meg tandem ismétlődések formájában a sejtmagban. Az élesztő fajokban található rDNS-génkomplext az **10. Ábra** mutatja be.



**10. Ábra.** Az élesztők rDNS-génkomplexe.

#### 5.1.1. *In silico* vizsgálatok

Munkánk első lépésében az NCBI internetes adatbázisban elérhető legfontosabb patogén *Candida*-k rDNS-szekvenciáit letöltöttük, majd a ClustalX programmal illesztettük. Azokat a szekvenciákat, melyek az illesztést követően az átlagos variabilitásnál nagyobb mutattak egy adott faj esetében, kizártuk a további analízisből. Az **1. Táblázatban** felsorolt referenciatorzsek (*Candida albicans* ATCC 10231, *C. dubliniensis* CBS 7987, *C. pulcherrima* CBS 5833, *C. glabrata* CBS 138, *C. guilliermondii* CBS 566, *C. inconspicua* CBS 180, *C. krusei* CBS 573, *C. lipolytica* CBS 6124, *C. lusitaniae* CBS 6936, *C. norvegensis* SZMC 198, *C. norvegica* CBS 4239, *C. parapsilosis* CBS 604, *C. tropicalis* CBS 94, *C. zeylanoides* CBS 619) ITS1-5.8S rRNS-ITS2 szakaszait az ITS1 és ITS4 indítószekvenciák felhasználásával

felszorzósítottuk, majd nukleotid sorrendjüket a Szegedi Biológiai Központ (SZBK) Szekvenáló Laboratóriumának munkatársai végezték el.

### 5.1.2. DNS-izoláló készletek tesztelése

A specifikus indítószekvenciák tervezése előtt teszteltünk nyolc kereskedelmi forgalomban kapható DNS-izoláló készletet (Norgen BioteK Yeast Genomic DNA isolation Kit, Epicentre® MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit, Omega Bio-Tek E.Z.N.A.® Yeast DNA Kit, Roche DNA Isolation Kit for Cells and Tissues, Qiagen DNeasy Tissue, Qiagen DNeasy Plant, Sigma-Aldrich Genelute™ Plant Genomic DNA Kit, MultiTarget Pharmaceuticals AquaGenomic™). A DNS-kivonás hatékonyságát *C. albicans* ATCC 102312 izolátumán teszteltük. A sejteket megközelítőleg az  $1 \times 10^8$ /ml-es sejtkoncentráció eléréséig tenyésztettük. Minden egyes DNS-izolálást a gyártó utasításainak pontos betartásával végeztünk. A kivonatok elemzését vizuálisan agaróz-gélelektroforézissel és Qubit™ Fluoriméter (Invitrogen) használatával végeztük. Az eredmények alapján három kit bizonyult a legalkalmasabbnak. Ezek közül könnyű kezelhetősége és alacsony ára miatt az Epicentre® MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit használata bizonyult a legmegfelelőbbnek (**2. Táblázat**) ezért a továbbiakban ezzel folytattuk kísérleteinket.

DNS-izoláló készlet	Az izolált DNS mennyisége
<i>Epicentre® MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit</i>	74,4 µg/ml
<i>Omega Bio-Tek E.Z.N.A.® Yeast DNA Kit</i>	10,04 µg/ml
<i>MultiTarget Pharmaceuticals AquaGenomic™</i>	2,77 µg/ml

**2. Táblázat.** A három legmegfelelőbb DNS-izoláló készlet és a kapott DNS-koncentrációk.

### 5.1.3. A specifikus indítószekvenciák tervezése

Az illesztések vizsgálata során a szakirodalmi adatoknak megfelelően az 5,8S rRNS-gének nagyfokú konzerváltságát figyeltük meg. Lehetőségünk nyílt egy olyan indítószekvencia megtervezésére (*Cand1*), mely számos *Candida* fajjal teljes homológiát mutatott (**11. Ábra**). Ezt követően megkezdtük a fajspecifikus indítószekvenciák tervezését,

melynek során nem alkalmaztunk célszoftvert. Célunk egy multiplex körülmények között alkalmazható PCR-technika kidolgozása volt, ezért a specifikus indítószekvenciák létrehozásánál figyelembe kellett venni a bekötési hőmérsékletek egybeesését és a várható termékek méretbeli különbözőségét.

Indítószekvencia	Bázissorrend	Bekötési hőmérséklet
<i>Cand1</i> közös indítószekvencia	5'-CTCTTGGTTCTCGCATCG-3'	54,2°C

<i>C. norvegensis</i> SZMC 198	AGAA--AGAAAA--AAATAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCG
<i>C. norvegensis</i> 2	AGAA--AGAAAA--AAATAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCG
<i>C. norvegensis</i> 3	AGAA--AGAAAA--AAATAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCG
<i>C. norvegensis</i> 4	AGAA--AGAAAA--AAATAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCG
<i>C. krusei</i> 4	TCTA--CGAAAA--CAAACTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCG
<i>C. krusei</i> 3	TCTA--CGAAAA--CAAACTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCG
<i>C. krusei</i> 2	TCTA--CGAAAA--CAAACTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCG
<i>C. krusei</i> CBS 573	TCTA--CGAAAA--CAAACTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCG
<i>C. guilliermondii</i> 2	CTT--TTGAATTAATCTTCAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG
<i>C. guilliermondii</i> CBS 566	ATT--TTGAATTAATCTTCAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG
<i>C. guilliermondii</i> 3	ATT--TTGAATTAATCTTCAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG
<i>C. guilliermondii</i> 4	ATT--TTGAATTAATCTTCAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG
<i>C. parapsilosis</i> 2	ATT--TTGAATTAATCTTCAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG
<i>C. parapsilosis</i> CBS 604	ATT--TTGAATTAATCTTCAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG
<i>C. parapsilosis</i> 3	ATT--TTGAATTAATCTTCAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG
<i>C. parapsilosis</i> 4	ATT--TTGAATTAATCTTCAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG
<i>C. lusitaniae</i> 3	ATTGGAATTTCTTAATA--TCAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG
<i>C. lusitaniae</i> 2	ATTGGAATTTCTTAATA--TCAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG
<i>C. lusitaniae</i> CBS 6936	ATTGGAATTTCTTAATA--TCAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG
<i>C. lusitaniae</i> 4	ATTGGAATTTCTTAATA--TCAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG
<i>C. glabrata</i> 2	TTTTAGTAGAAAACAACTTCAAAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG
<i>C. glabrata</i> CBS 138	TTTTAGTAGAAAACAACTTCAAAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG
<i>C. glabrata</i> 3	TTTTAGTAGAAAACAACTTCAAAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG
<i>C. glabrata</i> 4	TTTTAGTAGAAAACAACTTCAAAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACG

## 11. Ábra. A *Cand1* indítószekvencia tulajdonságai és bekötési helye az 5,8S rRNS-régióban.

Az 5,8S rRNS-géntől 5' irányban elhelyezkedő ITS2-régió alkalmasnak bizonyult a *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* és *C. glabrata* fajokra specifikus reakciók kidolgozására. Az utóbbi években megemelkedett a *Candida norvegensis* (ivaros alakja *Pichia norvegensis*) által okozott fertőzések száma, és a szakirodalmi adatok alapján számos izolátuma flukonazol-rezisztens (Sandven és mtsai., 1997, 2006), ezért megkíséreltük a kimutatására szolgáló indítószekvencia megtervezését. A specifikus indítószekvenciák bázissorrendjét, a bekötési hőmérsékleteket és a termékek várt hosszát a **3. Táblázat** mutatja be.

**3. Táblázat.** A *Cand1* közös indítószekvenciával együtt alkalmazható fajspecifikus indítószekvenciák tulajdonságai.

Indítószekvencia	Bázissorrend	Bekötési hőmérséklet	Várt hossz
<i>Ckrusrev</i>	5'–GACGCTCTTTACACGTCGTC–3'	55,6°C	196 bp
<i>Cguirev</i>	5'–AGAAATATCCCGCCACAC–3'	52,6°C	294 bp
<i>Clusrev</i>	5'–TCGAGGAATGCCTCGAG–3'	54,2°C	112 bp
<i>Cglabrev</i>	5'–GATTAATAGAGAAGCTTGCGC–3'	54,6°C	250 bp
<i>Cnorvrev</i>	5'–TACCTGATTTGAGGTCGAGC–3'	55,1°C	304 bp

A megtervezett indítószekvenciákat minden esetben összehasonlítottuk az NCBI internetes adatbázisával és nem tapasztaltunk olyan egyezést, amely befolyásolta volna a kimutatást. Ezek után megkezdtuk az indítószekvenciák tesztelését a referenciatörzseken. A reakciókhoz az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírt összetételű elegyet használtuk, a reakció lépései a következők voltak:

1. 94°C – 4 perc
2. 94°C – 30 másodperc
3. 55°C – 25 másodperc
4. 72°C – 1 perc → 2. lépés, 35 ciklusban
5. 72°C – 1 perc

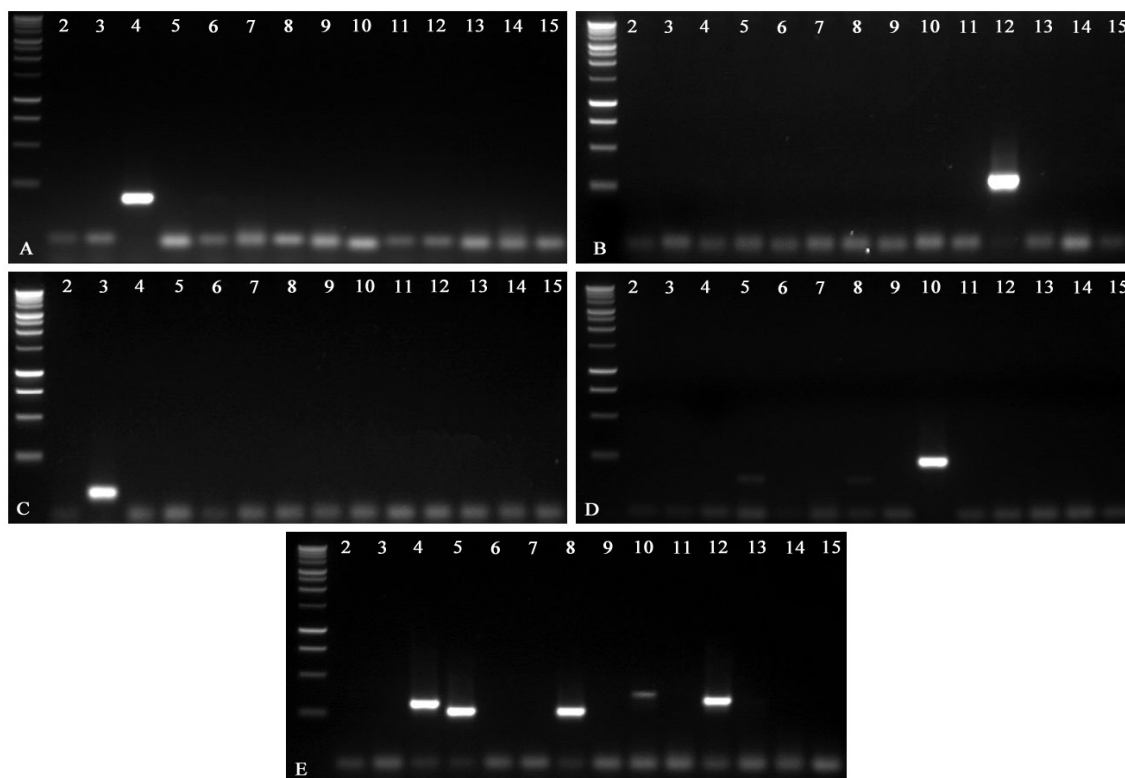
A kiértékelést horizontális gélelektroforetikus készülékkel végeztük TAE-puffer és 3%-os agaróz gél használatával. A minták futtatása 5-10 V/cm feszültséggel történt.

A *C. krusei*, *C. guilliermondii* és *C. lusitaniae* fajokra specifikus reakciókban a kapott termékek mérete megfelelt az előzetesen vártnak. Az indítószekvenciák a felhasznált referenciatörzsek egyikével sem adtak aspecifikus terméket (**12. Ábra**).

A *C. glabrata*-specifikus reakciókban a kapott termék szintén megfelelt a várt méretnek, de néhány esetben igen kis mennyiségű aspecifikus termék is megjelent. A tervezett indítószekvencia halvány jelet adott a *C. inconspicua* és a *C. norvegensis* esetében, de az amplikon mérete eltérő volt a specifikus terméktől. A reakció optimalizálása után ezeknek a termékeknek a megjelenése kiküszöbölhetővé vált.

A *C. norvegensis*-re tervezett kimutatási reakció ellenőrzése során a *C. krusei*, *C. inconspicua*, *C. glabrata* és *C. guilliermondii* izolátumok kapcsán is kaptunk jelet, és ezek

mindegyike eltérő méretűnek bizonyult. A vizsgált *C. norvegensis* izolátum PCR terméke nem eredményezett egyértelmű, erős jelet. Mivel a *Candida inconspicua* számos izolátuma csökkent flukonazol-érzékenységet mutat (Szabó és mtsai., 2008a, Majoros és mtsai., 2003), ezért azonosítása klinikai szempontból fontos lehet. A kapott szakaszok közötti méretkülönbségek azonban nem voltak számottevőek, ezért az öt faj megbízható azonosítására a reakció nem bizonyult alkalmasnak.



**12. Ábra.** A *Cand1* és a specifikus indítószekvenciákkal elvégzett PCR gélfotói. **A,** A *C. krusei*-specifikus reakció. **B,** A *C. guilliermondii*-specifikus reakció. **C,** A *C. lusitaniae*-specifikus reakció. **D,** A *C. glabrata*-specifikus reakció. **E,** A *C. norvegensis*-specifikus reakció. A sorrend minden esetben: 1 kb-os DNS-létra (Promega), **2.** *C. albicans* ATCC 10231, **3.** *C. lusitaniae* CBS 6936, **4.** *C. krusei* CBS 573, **5.** *C. inconspicua* CBS 180, **6.** *C. dubliniensis* CBS 7987, **7.** *C. tropicalis* CBS 94, **8.** *C. norvegensis* SZMC 198, **9.** *C. pulcherrima* CBS 5833, **10.** *C. glabrata* CBS 138, **11.** *C. parapsilosis* CBS 604, **12.** *C. guilliermondii* CBS 566, **13.** *C. zeylanoides* CBS 619, **14.** *C. lipolytica* CBS 6124, **15.** *C. norvegica* CBS 4239

A közös *Cand1* indítószekvencia felhasználásával a variábilis ITS-régiók ellenére sem tudtunk további reakciókat tervezni más fontos patogén *Candida* fajokra. Az elsődleges problémát a biztonságos elkülönítéshez elengedhetetlen méretbeli különbségek hiánya okozta. Az illesztések alapján megvizsgáltuk a 18S rRNS-régiót, és találtunk egy olyan szakaszt, amely megfelelőnek bizonyult egy új, közös indítószekvencia megtervezésére. A *Cand2*-es indítószekvencia alkalmazásával lehetőségünk nyílt a *C. albicans*, a *C. dubliniensis* és a *C. tropicalis* megbízható elkülönítésére, a rájuk specifikus indítószekvenciák felhasználásával (13. Ábra).

Indítószekvencia	Bázissorrend	Bekötési hőmérséklet
<i>Cand2</i> közös indítószekvencia	5'–CTGATTGCTTAATTGCACC–3'	53,6°C

<i>C. tropicalis</i> 4	TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGATTGCTTAATTGCACCACATGTGTTTTTATT
<i>C. tropicalis</i> 3	GCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGATTGCTTAATTGCACCACATGTGTTTTTATT
<i>C. tropicalis</i> CBS 94	-----TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGATTGCTTAATTGCACCACATGTGTTTTTATT
<i>C. tropicalis</i> 2	-----TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGATTGCTTAATTGCACCACATGTGTTTTTATT
<i>C. albicans</i> 4	-----GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGATTGCTTAATTGCACCACATGTGTTTTTATT
<i>C. albicans</i> 2	-----GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGATTGCTTAATTGCACCACATGTGTTTTTATT
<i>C. albicans</i> 3	-----GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGATTGCTTAATTGCACCACATGTGTTTTTATT
<i>C. albicans</i> ATCC 102312	-----TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGATTGCTTAATTGCACCACATGTGTTTTTATT
<i>C. dubliniensis</i> 4	-----TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGATTGCTTAATTGCACCACATGTGTTTTTATT
<i>C. dubliniensis</i> 2	-----GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGATTGCTTAATTGCACCACATGTGTTTTTATT
<i>C. dubliniensis</i> CBS 7987	-----TGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGATTGCTTAATTGCACCACATGTGTTTTTATT
<i>C. dubliniensis</i> 3	-----TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGATTGCTTAATTGCACCACATGTGTTTTTATT

**13. Ábra.** A *Cand2* indítószekvencia tulajdonságai és bekötési helye az 18S rRNS-régióban.

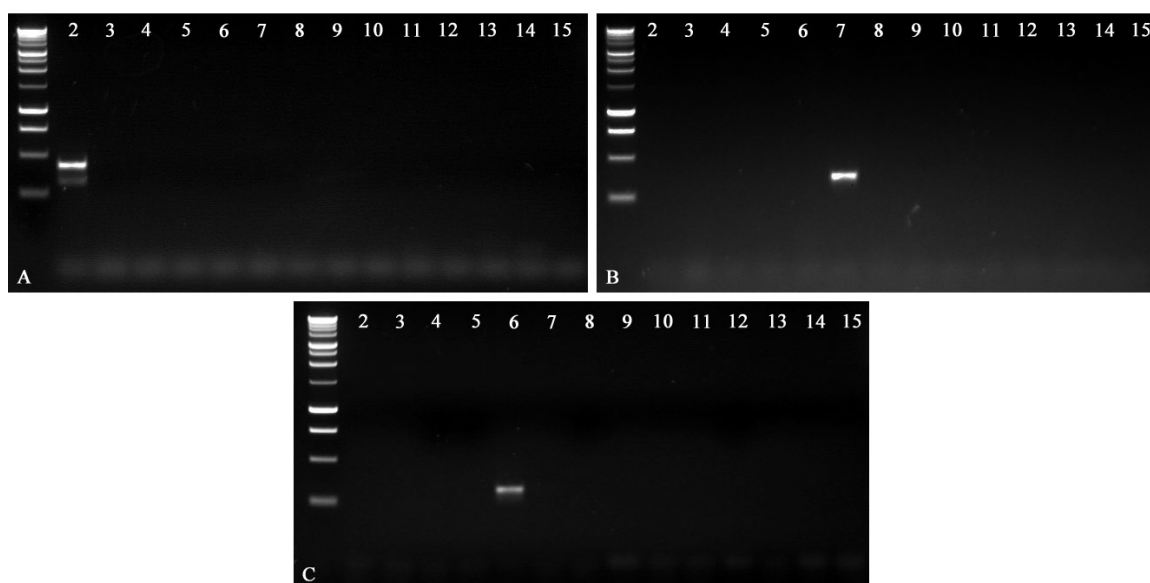
A közös indítószekvencia felhasználásával specifikus reakciókat terveztünk *C. albicans*, *C. dubliniensis* és *C. tropicalis* izolátumokra. Az előzőleg megtervezett *Cand1* közös indítószekvencia és specifikus párpai által kapott fragmentek a 112-től 294 bázispárig tartó tartományba estek, ezért a tervezés során ennél lehetőleg nagyobb terméket adó indítószekvenciákat kerestünk (4. Táblázat). A fajspecifikus indítószekvenciák megtervezésére a variábilis ITS2-szakasz bizonyult a legalkalmasabbnak.



**4. Táblázat.** A *Cand2* közös indítószekvenciával együtt alkalmazható fajspecifikus indítószekvenciák tulajdonságai.

Indítószekvencia	Bázissorrend	Bekötési hőmérséklet	Várt hossz
<i>Calbrev</i>	5'–GTGGTAGACGTTACCGCC–3'	53,2°C	433 bp
<i>Cdubrev</i>	5'–CAACACCAAACCCTAGGG–3'	53,0°C	324 bp
<i>Ctroprev</i>	5'–CGCTTAAAATAAGTTTCCACG–3'	55,5°C	378 bp

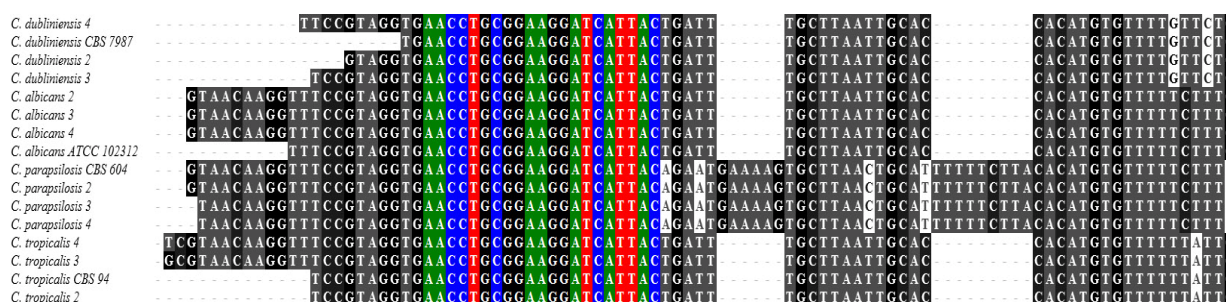
A *C. albicans*-ra tervezett reakciókban a specifikus termék mérete megfelelt az előzetesen vártnak, azonban egy kis intenzitású aspecifikus termék is megjelent a vizsgált mintában. A felhasznált referenciatörzsek esetében nem tapasztaltunk termékképződést. A *C. tropicalis* és a *C. dubliniensis* fajokra specifikus reakciókban a kapott termék mérete megegyezett a várt hosszal és egyik referenciatörzs esetében sem keletkezett aspecifikus termék (**14. Ábra**).



**14. Ábra.** A *Cand2* és a specifikus indítószekvenciákkal elvégzett PCR gélfotói. **A,** *C. albicans*-specifikus reakció. **B,** *C. tropicalis*-specifikus reakció. **C,** *C. dubliniensis*-specifikus reakció. A sorrend minden esetben: 1 kb-os DNS-létra (Promega), **2.** *C. albicans* ATCC 10231, **3.** *C. lusitaniae* CBS 6936, **4.** *C. krusei* CBS 573, **5.** *C. inconspicua* CBS 180, **6.** *C. dubliniensis* CBS 7987, **7.** *C. tropicalis* CBS 94, **8.** *C. norvegensis* SZMC 198, **9.** *C. pulcherrima* CBS 5833, **10.** *C. glabrata* CBS 138, **11.** *C. parapsilosis* CBS 604, **12.** *C. guilliermondii* CBS 566, **13.** *C. zeylanoides* CBS 619, **14.** *C. lipolytica* CBS 6124, **15.** *C. norvegica* CBS 4239

Céljaink között szerepelt egy *C. parapsilosis*-ra specifikus reakció megtervezése is, azonban *Cand2*-es indítószekvencia használata mellett nem volt alkalmunk olyan indítószekvencia megtervezésére, melynek használatával megfelelő méretű terméket kaptunk volna, ezért a közös indítószekvenciát újraterveztük (**15. Ábra**).

Indítószekvencia	Bázissorrend	Bekötési hőmérséklet
<i>Cand3</i> közös indítószekvencia	5'–AACCTGCGGAAGGATCATTAC–3'	58,5°C



**15. Ábra.** A *Cand3* indítószekvencia tulajdonságai és bekötési helye az 18S rRNS-régióban.

A *Cand3*-as indítószekvenciával már lehetőségünk nyílt egy *C. parapsilosis*-ra specifikus reakció megtervezésére (**5. Táblázat**). A *C. albicans*, *C. dubliniensis* és a *C. tropicalis* izolátumok esetében kapott amplikonok mérete átlagosan 20 bázispárral megnőtt.

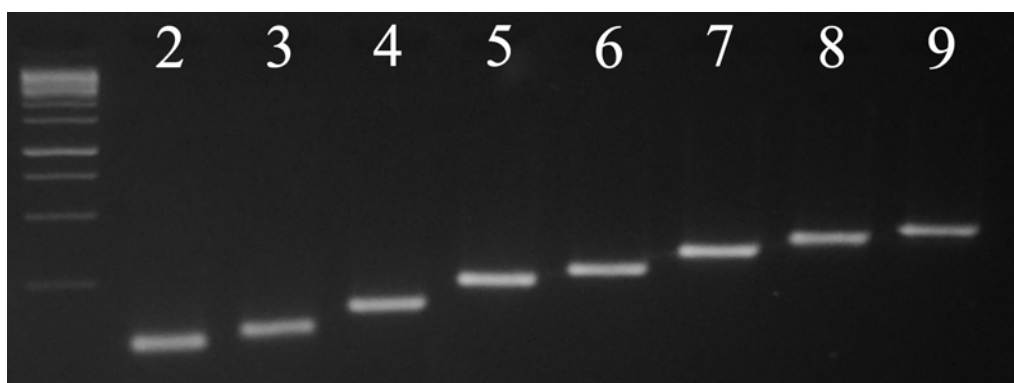
**5. Táblázat.** A *Cand3* közös indítószekvenciával együtt alkalmazható, *C. parapsilosis*-ra specifikus indítószekvencia tulajdonságai.

Indítószekvencia	Bázissorrend	Bekötési hőmérséklet	Várt hossz
<i>Cparrev</i>	5'–GGTTGAGTTTAATCTCTGGCAG–3'	56,2°C	130 bp

Kísérleteink alapján az indítószekvenciák megbízhatónak bizonyultak nyolc *Candida* faj azonosítására (**16. Ábra**). Munkánk következő lépésében megkezdtük a PCR-program optimalizálását. Mivel a legnagyobb kapott termék sem haladta meg az 500 bázispárt, lehetőségünk nyílt a ciklusok idejének rövidítésére, melynek eredményeként egy igen rövid, nagyjából egy órát igénylő reakciót sikerült beállítanunk.

Az optimalizált PCR körülményei az alábbiak voltak:

1. 94°C – 30 másodperc
2. 94°C – 5 másodperc
3. 58°C – 17 másodperc → 2. lépés, 10 ciklusban
4. 94°C – 5 másodperc
5. 60°C – 17 másodperc → 4. lépés, 35 ciklusban
6. 72°C – 30 másodperc

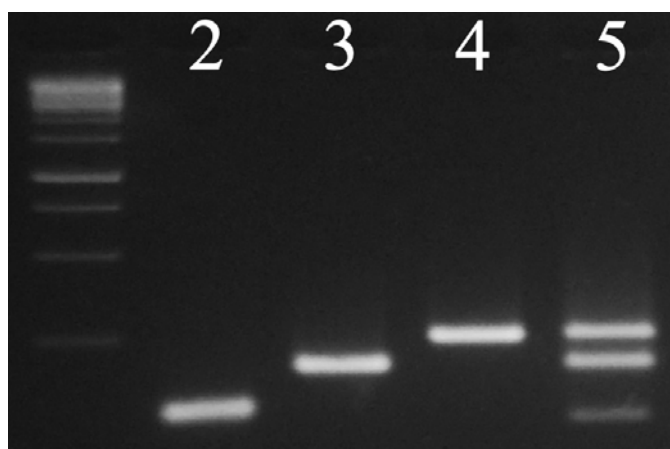


**16. Ábra.** Az újratervezett *Cand3*-as és a *C. parapsilosis*-specifikus indítószekvenciákkal kiegészített kimutatási reakciók. A sorrend: 1 kb-os DNS-létra (Promega), **2.** *C. lusitaniae* CBS 6936, **3.** *C. parapsilosis* CBS 604, **4.** *C. krusei* CBS 573, **5.** *C. glabrata* CBS 138, **6.** *C. guilliermondii* CBS 566, **7.** *C. dubliniensis* CBS 7987, **8.** *C. tropicalis* CBS 94, **9.** *C. albicans* ATCC 10231

#### 5.1.4. Multiplex PCR kidolgozása

A reakciók megtervezése során fontos szempont volt, hogy lehetőséget biztosítsunk multiplex reakció kivitelezésére is. A DNS-kivonatokat egységes (~50 ng/μl) koncentrációjúra hígítottuk, és a kimutatást először négy indítószekvencia használatára optimalizáltuk (**17. Ábra**). A reakcióelegyet az Anyagok és módszerek fejezetben említettek alapján állítottuk össze, csak a felhasznált indítószekvenciák koncentrációján változtattunk. A közös indítószekvenciából 3,5 pmol-t, a specifikus indítószekvenciákból 1,5-1,5 pmol-t alkalmaztunk. Az így kivitelezett reakciók nem biztosítottak megfelelő detektálási

lehetőséget, mivel a kapott DNS-fragment méretek közel eshettek egymáshoz, és a keletkezett termékek intenzitásában is különbségek adódhattak, megnehezítve a vizuális azonosítást.



**17. Ábra.** Multiplex PCR a *Cand1*-es és a *C guilliermondii*, *C. glabrata* és a *C. lusitaniae* specifikus indítószekvenciák használatával. Sorrend: 1 kb-os DNS-létra (Promega), **2.** *C. lusitaniae* CBS 6936, **3.** *C. glabrata* CBS 138, **4.** *C. guilliermondii* CBS 566, **5.** Multiplex PCR mindhárom *Candida* DNS-kivonatának együttes felhasználásával.

Végül a már korábban optimalizált PCR-program alkalmazásával három indítószekvencia együttes használata mellett döntöttünk, amely egyszerre két *Candida* faj kimutását teszi lehetővé egy reakcióban. A közös indítószekvenciából 4 pmol-t, a specifikus indítószekvenciákból 2-2 pmol-t használtunk fel a reakciók során. Ezzel a megoldással jelentősen csökkenteni lehetett a kimutatás idő- és költségigényét. A megbízható azonosításhoz a **6. Táblázatban** szereplő indítószekvencia-kombinációk bizonyultak megfelelőnek.

**6. Táblázat.** Az együtt alkalmazható indítószekvenciák és a PCR termékek mérete.

Indítószekvencia	Specifikus indítószekvencia-kombináció	Kapott termékek mérete (bp)
<i>Cand1</i> közös indítószekvencia	<i>Clus</i> + <i>Cglab</i>	112+250 bp
	<i>Ckrus</i> + <i>Cgui</i>	196+294 bp
<i>Cand3</i> közös indítószekvencia	<i>Cdub</i> + <i>Calb</i>	344+453 bp
	<i>Cpar</i> + <i>Ctrop</i>	130+398 bp

### 5.1.5. Az ellenőrző reakciók kifejlesztése

Célul tűztük ki egy ellenőrző reakció kifejlesztését is, mellyel rDNS-régióra tervezett kimutatásokat lehet megerősíteni más lokuszokra tervezett specifikus reakciókkal. A lehetséges célszekvenciák közül a tanszékünkön egyéb mikroorganizmusok kapcsán korábban már vizsgált nagy affinitású vas-permeáz (*FTR*) és a foszfolipáz D (*PLD*) fehérjét kódoló DNS-szakaszokat választottuk ki. A foszfolipáz D *C. albicans*-ban bizonyítottan a dimorfizmussal, ezáltal a patogenitással összefüggésbe hozható fehérje (McLain és Dolan, 1997). A *PLD* ezen felül a foszfolipidek foszfodiészter-kötéseinek hidrolíziséért felelős, és szerepet játszik szignáltranszdukciós folyamatokban is (Dolan és mtsai., 2004, Ghannoum, 2000). A nagy affinitású vas-permeázok fontos szerepet játszanak a biológiai folyamatokhoz nélkülözhetetlen vas felvételében olyan körülmények között, ahol az nem megfelelően hozzáférhető, és bizonyítottan szerepük van a patogenézis során (Ibrahim és mtsai., 2010, Ramanan és Wang, 2000). A referenciatorzsek mindegyikéből sikeresen felszaporítottuk a nagy affinitású vas-permeáz kódoló gén egy szakaszát. A specifikus indítószekvenciák tervezése során azonban az *FTRI*-génszakaszok felhasználásával elkészített szekvenciaillesztések alapján nem volt lehetséges a megbízható reakció kifejlesztése. A szekvenciák magas fokú DNS-szintű variabilitással rendelkeztek, de a vizsgált szakaszokon belül nem tették lehetővé a megfelelő fajspecifikus reakció kidolgozását. A *PLD*-fehérjét kódoló gén egy szakaszát a *C. pulcherrima* kivételével minden referenciatorzsból sikeresen felszaporítottuk. A *PLD*-szekvenciák analízise során nyolc fontos humán patogén elkülönítésére nyílt lehetőség. Az azonosítható fajok közül hét megegyezett a riboszómális szakaszra tervezett indítószekvenciákkal kimutatható fajokkal (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*). Ez a génszakasz nem tette lehetővé *C. lusitaniae* izolátumok detektálását. Felszaporítottuk egy az elmúlt években egyre több fertőzést okozó másik faj, a *Candida kefyr* (Weichert és mtsai., 2012, Reuter és mtsai., 2005) foszfolipáz D-t kódoló génjének egy szakaszát is. Az elemzés alapján lehetségesnek bizonyult egy specifikus indítószekvencia kidolgozása az adott fajra.

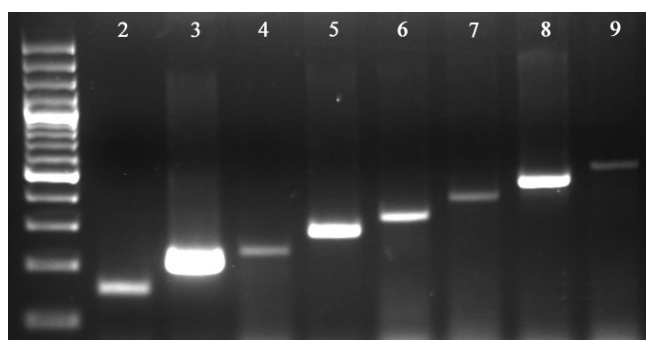
A vizsgált *PLD*-szekvenciák nem rendelkeztek olyan nagyfokú homológiát mutató szakaszokkal, mint az rDNS-régió, ezért nem volt lehetőség kettőnél több faj kimutatására alkalmas, közös indítószekvenciák tervezésére. Lehetőség volt azonban olyan reakciókat tervezni, amelyben egy közös és két fajspecifikus indítószekvencia kombinálása vált lehetővé. A közös indítószekvenciákat a *C. albicans*/*C. dubliniensis*, *C. glabrata*/*C. kefyr*, *C.*

*tropicalis*/*C.guilliermodii* és a *C. parapsilosis*/*C. krusei* fajokra lehetett megtervezni (7. Táblázat).

**7. Táblázat.** A *PLD*-génszakaszra tervezett közös és fajspecifikus indítószekvenciák tulajdonságai.

Indítószekvencia	Bázissorrend	Bekötési hőmérséklet	Várt hossz
<i>CalbdubP</i>	5'-CCTTCTCTATGTGCTCGAATGA-3'	53,9°C	-
<i>CalbPrev</i>	5'-GAGTTAAAGATTTCTGGAACCTCG-3'	53,6°C	475 bp
<i>CdubPrev</i>	5'-CATGGACTAGATGGTACCTGC-3'	53,9°C	258 bp
<i>CglabkefP</i>	5'-CATCATGCCAAGGCATTCTAGG-3'	55,6°C	-
<i>CglabPrev</i>	5'-CGGTAGCGTTTATGGGAGGA-3'	55,7°C	210 bp
<i>CkefPrev</i>	5'-CTGGTCATTGAGCGAAGCTCT-3'	56,7°C	542 bp
<i>CtropguiP</i>	5'-CACGATTGGTGGCTTTCTCC-3'	55,7°C	-
<i>CtropPrev</i>	5'-ATCCGCTGTATCATAACGACCA-3'	55,5°C	342 bp
<i>CguiPrev</i>	5'-GCAACAGTCTGGTCAATGACA-3'	55,1°C	293 bp
<i>CparkrusP</i>	5'-GTCGTGCCAAGGCATCCT-3'	56,8°C	-
<i>CparPrev</i>	5'-GAACAACCTGTTGCCACTGACT-3'	55,3°C	408 bp
<i>CkrusPrev</i>	5'-GACATGGAGAAGCTGCGGT-3'	56,6°C	156 bp

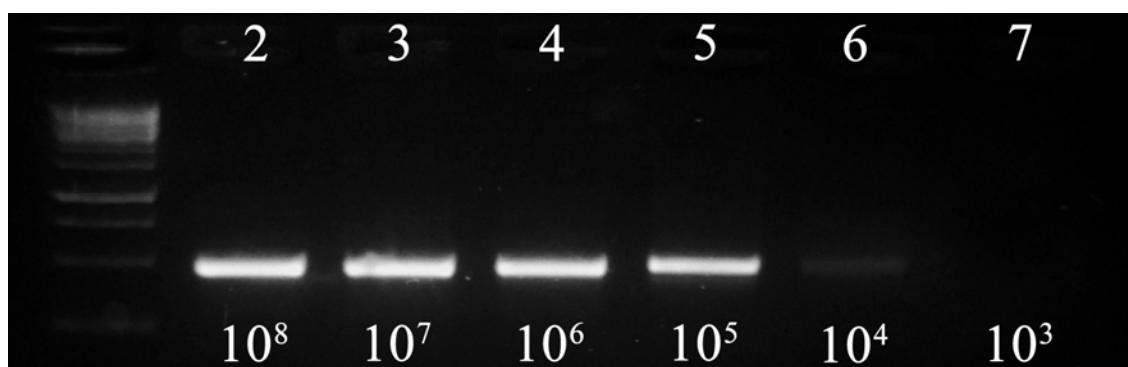
A megtervezett indítószekvenciákat sikerrel teszteltük a referenciatörzseken. Aspecifikus termék jelenlétét egyetlen reakcióban sem tapasztaltuk, és a kapott termékek minden esetben az adott fajra jellemző mérettel rendelkeztek (**18. Ábra**). A *rDNS*-szakaszra tervezett specifikus reakciókhoz hasonlóan a multiplex reakcióban a három indítószekvencia használata bizonyult megfelelőnek.



**18. Ábra.** A *PLD*-génszakaszra tervezett kimutatási reakciók. Sorrend: 100 bp-os DNS-létra (Fermentas), **2.** *C. krusei* CBS 573, **3.** *C. glabrata* CBS 138, **4.** *C. dubliniensis* CBS 7987, **5.** *C. guilliermondii* CBS 566, **6.** *C. tropicalis* CBS 94, **7.** *C. parapsilosis* CBS 604, **8.** *C. albicans* ATCC 10231, **9.** *C. kefyr* SZMC 1511

### 5.1.6. A reakciók érzékenységének tesztelése

A specifikus reakciókat hagyományos kolónia-PCR segítségével is teszteltük. Minden esetben működött a kimutatás az rDNS- és a *PLD*-génszakaszok használatával is. Az érzékenységi vizsgálatokat szintén az élesztősejtek DNS-kivonás nélküli, közvetlen felhasználásával végeztük. Friss tenyészeteket hoztunk létre YPD tápoldatban, majd Bürker-kamra segítségével megszámoltuk a sejteket. Desztillált vízben megközelítőleg  $1 \times 10^8$  sejt/ml-es szuszpenziót készítettünk a tenyészetekből, majd tízszeres léptékű hígítási sort készítettünk, melynek utolsó tagja megközelítőleg  $1 \times 10^3$  telepképző egység/ml volt. A hígítási sor tagjaiból 1  $\mu$ l-t használtunk templátként a reakciókban. Nem multiplex körülmények között alkalmazva a  $10^4$  sejt/ml esetében a kapott jel intenzitása nem volt megfelelő az egyértelmű kimutatáshoz, azonban a  $10^5$  sejt/ml-es koncentráció már jól azonosítható jelet eredményezett. A reakció érzékenysége 10 és 100 sejt/reakció közé esett. A *PLD*-génszakaszra tervezett reakció érzékenysége a  $10^5$ - $10^6$  sejt/ml-es tartományban bizonyult megfelelőnek (19. Ábra).



**19. Ábra.** Az rDNS-génszakaszra tervezett kimutatási reakció érzékenységének vizsgálata a *C. albicans*-ra specifikus kolónia-PCR segítségével. Sorrend: 1 kb-os DNS-létra (Promega), 2.-7. az alkalmazott sejtkoncentrációk (sejt/ml)

## 5.2. A *Candida parapsilosis* izolátumok genetikai variabilitása

### 5.2.1. A kapott izolátumok elsődleges vizsgálata

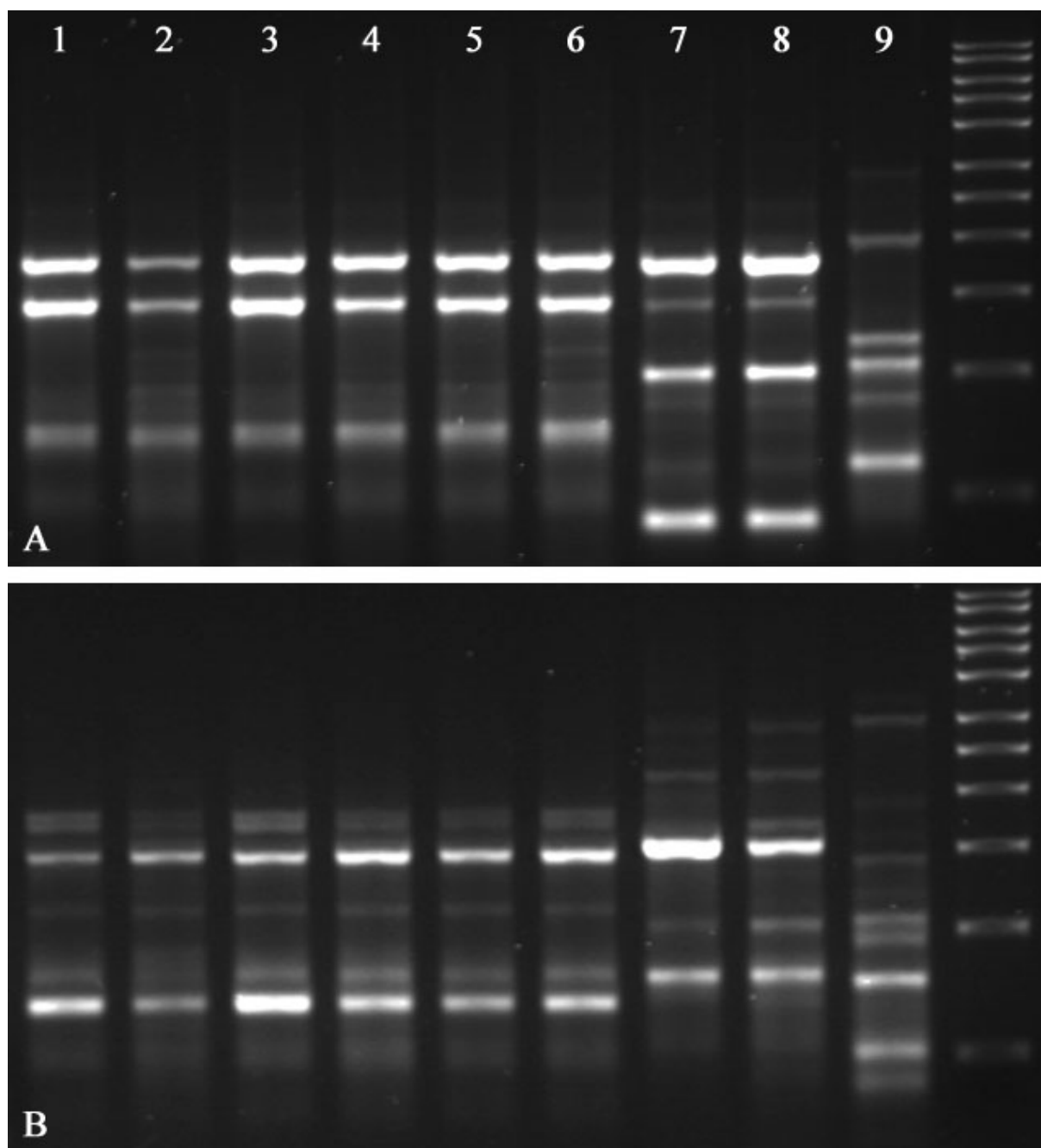
A tanszékünkre érkezett, a debreceni és pécsi klinikákon standard morfológiai és fiziológiai módszerekkel azonosított 103 illetve 106 *Candida* izolátum közül összesen 26 (10 debreceni és 16 pécsi) tartozott a tágabb értelemben vett *C. parapsilosis* fajhoz. A Luo és Mitchell (2002) által tervezett, *C. parapsilosis sensu lato* csoportra specifikus indítószekvenciákkal 8 debreceni és 12 pécsi izolátum esetében erősítettük meg a korábbi identifikálás eredményét. A tévesen *C. parapsilosis*-nak azonosított minták a későbbi ITS-szekvenciaanalízis eredményei alapján a *C. lusitaniae* (2 izolátum), *C. krusei* (3 izolátum) és *C. albicans* (1 izolátum) fajokhoz tartoztak. A *C. krusei* Bp47, Bp63 és Bp86 izolátumok kivételével a nem *C. parapsilosis* törzseket a további vizsgálatokból kizártuk (Kocsubé és mtsai., 2007).

### 5.2.2. RAPD-analízis

A RAPD-reakciók során 21 darab random dekamer indítószekvenciát használtunk fel. Az izolátumok összességében alacsony szintű genetikai variabilitást mutattak (**20. Ábra**). A legtöbb esetben nagyon hasonló vagy teljesen azonos mintázatot kaptunk, ami a szakirodalmi adatokkal összhangban van (Tavanti és mtsai., 2005, Lin és mtsai., 1995, Lehmann és mtsai., 1992). A mintázatok alapján elkészített távolság mátrix létrehozásakor csak azokat a sávokat használtuk fel, melyek három független ismétlésben is jelen voltak. A mátrixot végül összesen 72 darab informatív sáv alapján állítottuk össze. Kulcsoportnak az általunk azonosított *C. krusei* Bp86 és Bp63 izolátumokat használtuk fel.

Az előállított dendrogramon a minták két fő csoportot képeztek. A 12821-es és a Bp57-es izolátumok elkülönültek a többi *C. parapsilosis*-tól. Az eredmények magas támogatottsági értékekkel (bootstrap) bírtak (**21. Ábra**).





**20. Ábra.** Az OPR-15 (A) és az OPC 18 (B) dekamerekkel kapott RAPD-profil: **1.** *C. parapsilosis* 5312, **2.** *C. parapsilosis* 5308, **3.** *C. parapsilosis* Bp73, **4.** *C. parapsilosis* Bp46, **5.** *C. parapsilosis* 25329, **6.** *C. parapsilosis* Bp42, **7.** *C. metapsilosis* 12821, **8.** *C. metapsilosis* Bp57, **9.** *C. krusei* Bp47, 1 kb DNS-létra (Promega)

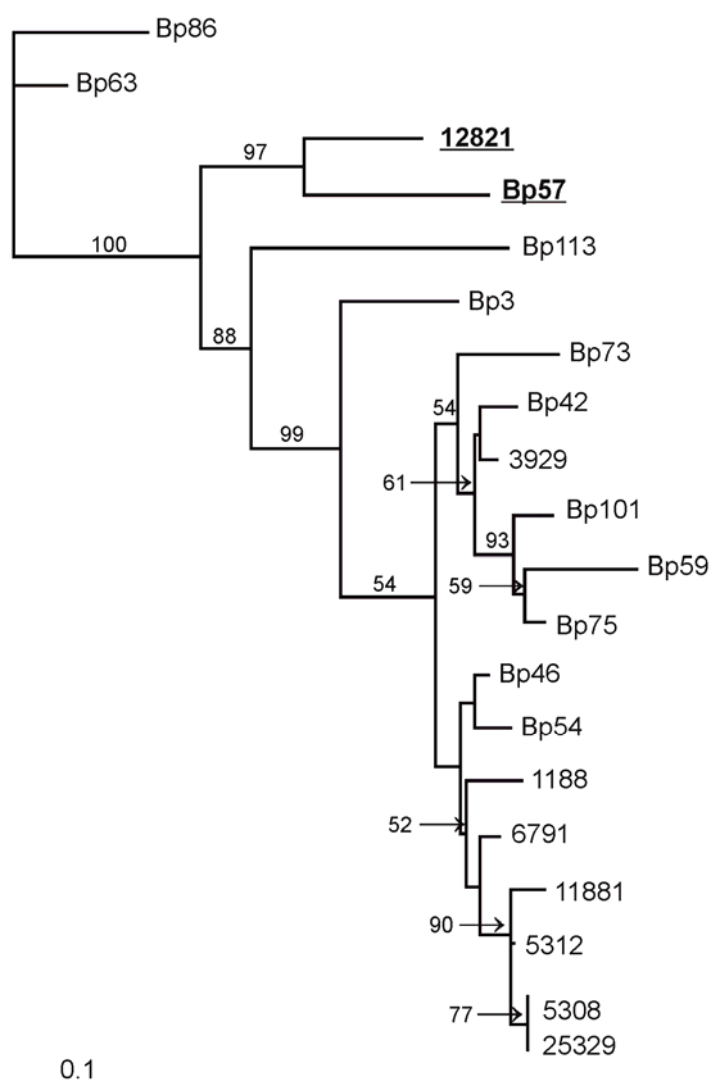
### 5.2.3. A *C. parapsilosis* izolátumok elkülönítése

A *C. parapsilosis* I-es csoportjára, azaz a mostani *C. parapsilosis* fajra specifikus PCR (Pontieri és mtsai., 2001) során szintén elkülönült a 12821 és a Bp57 törzs, esetükben nem

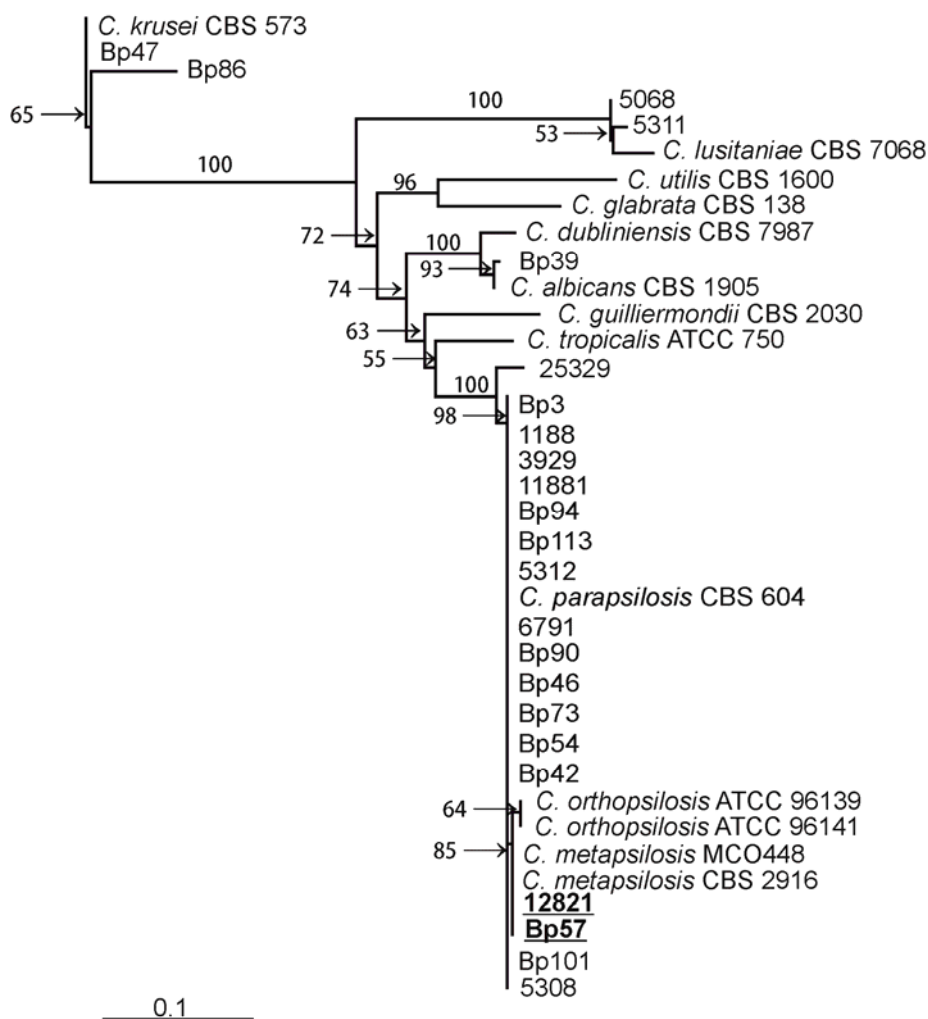
kaptuk meg a várt terméket. Az általunk tervezett *C. parapsilosis sensu lato* csoportra specifikus kimutatási reakcióban minden izolátum esetében kaptunk terméket.

#### 5.2.4. ITS-szekvenciaelemzés

Az ITS1 és az ITS4 indítószekvenciákkal felszaporítottuk az ITS1, 5,8 rRNS és ITS2-régiókat. A szekvenálási adatok és a filogenetikai analízis kimutatták, hogy a 12821 és a Bp57 törzsek a ritkán izolált *C. metapsilosis* fajhoz tartoznak (**22. Ábra**). A 12821-es jelű debreceni minta vérből, a Bp57-es jelű pécsi minta nyelöcsőből származott.



**21. Ábra.** A tágabb értelemben vett *C. parapsilosis* izolátumok RAPD-vizsgálata alapján készült neighbor-joining fa. Az ágak feletti számok a támogatottsági értékek. A *C. metapsilosis* izolátumokat aláhúzással jelöltük.



**22. Ábra.** A vizsgált *Candida* izolátumok ITS-szekvenciaadatai alapján készült neighbor-joining fa. Az ágak feletti számok a támogatottsági értékek. A *C. metapsilosis* izolátumokat aláhúzással jelöltük.

#### 5.2.5. A *C. parapsilosis* izolátumok fenotipikus variabilitása

##### 5.2.5.1. Szénhidrát-asszimilációs tesztek

Elvégeztük a szénhidrát-asszimilációs kísérleteket az azonosított *C. parapsilosis* és *C. metapsilosis* izolátumokon. A kísérletekben az API 20C AUX (Biomérieux) tesztet alkalmaztuk. A teszt Lin és munkatársai (1995) vizsgálatával megegyező eredményt adott, azaz az általunk vizsgált izolátumok közül csak a két *C. metapsilosis* volt képes asszimilálni a D-xilitolt, míg a *C. parapsilosis* izolátumok képtelenek voltak hasznosítani azt.

#### 5.2.5.2. Antifungális érzékenységi teszt

Megvizsgáltuk az izolált *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* és a *C. albicans* ATCC 90028 törzsek antifungális szerekkel szembeni érzékenységét Etest 95 (AB Biodisk) segítségével. A korábbi szakirodalmi adatok szerint a *C. parapsilosis* izolátumok antifungális érzékenységi határai (MIC) amfotericin B-vel szemben 0,03-2 µg/ml, flukonazollal szemben 0,06-16 µg/ml, itrakonazollal szemben 0,03-2 µg/ml, míg vorikonazollal szemben 0,02-1 µg/ml (Lin és mtsai., 1995, Rex és mtsai., 1995, Pfaller és mtsai., 2001, Lu és mtsai., 2004, St-Germain és mtsai., 2001, Tortorano és mtsai., 2004, 2006, de Hoog és mtsai., 2000).

Az általunk vizsgált *C. parapsilosis* és *C. metapsilosis* izolátumoknál kapott értékek a korábbi vizsgálatok által leírt, *C. parapsilosis*-ra jellemző tartományon belülre estek (**8. Táblázat**). A Bp57 és a 12821 törzsek adatainak átlagát nézve, a két *C. metapsilosis* izolátum érzékenyebbnek bizonyult amfotericin B-vel és vorikonazollal szemben, mint a *C. parapsilosis* izolátumok. Ez a megfigyelés összhangban van Lin és munkatársainak (1995) vizsgálataival, melynek során az akkori III-as csoport az I-es csoportnál alacsonyabb MIC-értéket mutatott amfotericin B-vel szemben.

**8. Táblázat:** Az antifungális érzékenységi vizsgálatok eredményei.

	Itrakonazol (µg/ml)	Vorikonazol (µg/ml)	Amfotericin B (µg/ml)	Flukonazol (µg/ml)
<i>C. parapsilosis</i>	0,005 (0,002-0,008)	0,0368 (0,008-0,064)	0,2157 (0,032-0,5)	1,725 (0,25-4)
<i>C. metapsilosis</i> Bp57	0,008	0,032	0,125	2
<i>C. metapsilosis</i> 12821	0,032	0,016	0,032	4
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	0,004	0,008	0,03-0,06	0,025-0,5

#### 5.2.6. A *C. parapsilosis* gyakorisága a vizsgált kórházakban

A vizsgált 209 izolátumból 20 tartozott a tágabb értelemben vett *C. parapsilosis* fajhoz, tehát a két kórházban 2004-2005 során a kórokozó *Candida* izolátumok 9,6 %-át ez a faj tette ki. 1997 és 1999 között Európában a kandidémiák 19%-át *C. parapsilosis* váltotta ki (Pfaller és mtsai., 2001). A tanulmány Észak- és Dél-Amerikából, valamint Európából származó mintákkal foglalkozott, ezért a vizsgálat világméretűnek tekinthető. Összességében a *C. parapsilosis* 15%-os gyakoriságú volt. Egy európai felmérés, szintén 1997 és 1999

közötti adatai 12,6 %-os *C. parapsilosis* okozta véráram-fertőzésről számolnak be (Tortorano és mtsai., 2006). 2003-ban valamennyi *Candida*-fertőzés 17,3%-át a *C. parapsilosis* és rokon fajtái idézték elő (Messer és mtsai., 2006). A Pfaller és munkatársai (2008) által 2001 és 2006 között elvégzett, több mint 90 kórház adatait feldolgozó felmérés szerint a fertőzéseket kiváltó *Candida* fajoknak Kelet-Ázsiában 16,14%-a, Latin-Amerikában 18,73%-a, Európában 10,67%-a, míg Észak-Amerikában 14,1%-a *C. parapsilosis* volt. Az 1996 és 2000 közötti adatok alapján készült magyarországi felmérésben a kandidémiák 4,9%-át okozta *C. parapsilosis* (Dóczi és mtsai., 2002).

### 5.2.7. Molekuláris kimutatás kifejlesztése a *C. parapsilosis sensu lato* csoportra

A tanszékünkön működő, Dr. Gácsér Attila által vezetett csoport számos klinikai *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* izolátumot analizált az elmúlt években. Az azonosítást megkönnyítendő felkérték csoportunkat egy specifikus PCR kidolgozására, amely alkalmas a három közeli rokon faj elkülönítésére. Az NCBI génbanki szekvenciáinak és saját adatbázisunknak felhasználásával specifikus indítószekvenciákat terveztünk a *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* fajokra. A vizsgált szakaszok (18S-ITS1-5,8S-ITS2) alapján lehetségesnek bizonyult a specifikus kimutatási reakció megtervezése a három fajra. A 18S rRNS ITS1-régióhoz közeli szakaszára közös indítószekvenciát terveztünk. A fajspecifikus indítószekvenciák megtervezéséhez a variábilis ITS1-szakasz nyújtott lehetőséget (9. Táblázat).

**9. Táblázat.** Az rDNS-génkomplexre tervezett közös indítószekvencia és a *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* fajokra specifikus indítószekvenciák tulajdonságai.

Indítószekvencia	Bázissorrend	Bekötési hőmérséklet	Várt hossz
<i>Cparortmet</i> (közös)	5'-GCTACTACCGATTGAATGGCT-3'	54,2°C	-
<i>Cparrev</i>	5'-GCCCCATATAGAAGGCCTAC-3'	53,3°C	246 bp
<i>Cortrev</i>	5'-GACTATTAGTTAATCAGTTGACTTA-3'	48,3°C	297 bp
<i>Cmetrev</i>	5'- AGGATTGCAGTTAAGCAACCT -3'	54,1°C	190 bp
<i>Cmetrev2</i>	5'- AAGGGTCGCAGTTAAGCG -3'	54,5°C	192 bp

A génbanki szekvenciák elemzése során a vizsgált *C. metapsilosis* izolátumok ITS1 nukleotid sorrendjei között néhány esetben jelentősebb különbséget tapasztaltunk, ezért terveztünk egy erre a szakaszra specifikus indítószekvenciát is (*Cmetrev2*). Az

indítószekvenciákat Dr. Gácsér Attila kutatócsoportja sikerrel tesztelte a törzsgyűjteményünkben található és az általuk beszerzett, korábban már ITS-szekvenciaanalízis segítségével meghatározott 67 *C. parapsilosis*, 15 *C. orthopsilosis* és 10 *C. metapsilosis* izolátumon. A vizsgált törzsek között sikeresen azonosítottunk két olyan *C. metapsilosis* izolátumot (CP 92 és CP 376), melyek a génbanki szekvenciák alapján tervezett *Cmetrev2* indítószekvenciával mutattak teljes homológiát. Néhány klinikai izolátum rDNS-szekvenciái és génbanki szekvenciák felhasználásával filogenetikai fát készítettünk (23. Ábra).



**23. Ábra** Néhány klinikai és törzsgyűjteményből származó izolátum ITS-szekvenciaadatai alapján készült MP (Maximum Parsimony) fa. A topológia számításakor a Close-Neighbor-Interchange algoritmust alkalmaztuk. Az elágazási pontokban feltüntetett számok a támogatottsági értékek.

A filogenetikai fán igen magas támogatottsággal különült el a két, általunk vizsgált izolátum a többi *C. metapsilosis* izolátumtól. A illesztésben szereplő 410 nukleotidot felölelő szakaszon 9 eltérést tapasztaltunk a *C. metapsilosis* törzsek két csoportja között, melyekből hét parszimónia szempontjából informatív helynek bizonyult. Hasonló megfigyeléseket tettek Gomez-Lopez és munkatársai (2008) spanyol klinikai izolátumok ITS-szekvenciaanalízise során. Mirhendi és munkatársai (2010) egy másodlagos alkohol-dehidrogenáz gén (SADH), ITS-régiók és a 26S rRNS-régiók együttes vizsgálata során szintén két különálló *C. metapsilosis* csoportot azonosítottak.

Célul tűztük ki további két génszakasz vizsgálatát a két különálló *C. metapsilosis* törzs esetében. Felszaporítottuk a transzlációs elongációs faktor 1-alfa (TEF1- $\alpha$ ) és a 18S rRNS-gének egy-egy szakaszát két-két *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* és a *C. metapsilosis* csoportok tagjaiból és illesztettük őket. A 18S rRNS-szakaszok nem bizonyultak alkalmasnak a két *C. metapsilosis* csoport elkülönítésére. A TEF1- $\alpha$  génszakaszok esetében megfigyelhettünk különbségeket a csoportok szekvenciái között, azonban ezek sem támogatták az egyértelmű elkülönítést. A közeljövőben további gének (aktin, citokróm oxidáz, RNS-polimeráz II) vizsgálatát tervezzük.

### 5.3. Antifungális szerek és sztatinok kölcsönhatásainak *in vitro* vizsgálata

Célunk egy olyan hatékony antifungális szer/sztatin kombináció kimutatása volt, mely alkalmas lehetne felületi kezelésre szánt készítmény kifejlesztésére. A sztatinok a korábbi szakirodalmi adatok alapján hatásosnak bizonyultak *Candida* fajok ellen (Schmidt és mtsai., 2009 Chin és mtsai., 1997), azonban az emberi szérumban elérhető koncentrációknál jóval magasabb koncentrációkban (Galgóczy és mtsai., 2009). Felületi készítmény alkalmazása során azonban a hatékony gátláshoz szükséges koncentrációk már alkalmazhatóvá válnak. A sztatin/antifungális szer kombinációk esetében azt is figyelembe kell venni, hogy az adott kombinációs partnerek mely májban található citokróm P450 enzimek által metabolizálódnak. Az azonos májenzimek által feldolgozott sztatin és antifungális szer kombinációk komoly mellékhatásokkal bírhatnak (Galgóczy és mtsai., 2011). Felületi készítmények esetében ezzel a hatással nem kell számolni.

#### 5.3.1. A vizsgálatokat megelőző kutatások

A tanszékünkön folyt korábbi kutatások alkalmával meghatároztuk a ketokonazol, flukonazol, itraconazol, primycin, amfotericin B és a nystatin, valamint a **9. Táblázatban** található sztatinok MIC-értékeit, majd elvégeztük a kombinációs kísérleteket is *Candida albicans* ATCC 90028 és *Candida glabrata* CBS 138 törzsek esetében (Nyilasi és mtsai., 2010a,b,c).

A teljes gátláshoz szükséges ketokonazol-koncentráció *C. albicans* esetében 16 µg/ml-nél magasabbnak adódott, azonban 0,5-1 µg/ml-es tartományban 100%-os gátlást értünk el a *C. glabrata* esetében. A vizsgált *C. albicans* törzs esetében a flukonazollal és az itraconazollal végrehajtott kísérletekben szintén nem tudtuk meghatározni a teljes gátláshoz szükséges hatóanyag-koncentrációt. Az vizsgált legmagasabb koncentráció fukonazol esetében 64 µg/ml, itraconazol esetében 16 µg/ml volt. A *C. glabrata* izolátum MIC-értéke flukonazol esetében 8-16 µg/ml-nek, itraconazol esetében pedig 0,5 µg/ml-nek adódott. A primycin 64 µg/ml-es koncentrációban 100%-os gátlást eredményezett *C. albicans* esetében, míg a *C. glabrata*-t már 32 µg/ml-es koncentrációban is teljesen gátolta. Az amfotericin B mindkét izolátumot 100%-osan gátolta 1 µg/ml-es koncentrációban, míg a nystatin teljes gátláshoz



szükséges koncentrációja *C. albicans* esetében 2 µg/ml-nek, *C. glabrata* esetében pedig 1 µg/ml-nek bizonyult.

A sztatínok közül a szimvasztatin és a fluvasztatin bizonyult a leghatékonyabbnak. A szimvasztatin 8 µg/ml-es koncentrációban teljes gátlást okozott *C. albicans* és 32 µg/ml-es koncentrációban pedig *C. glabrata* esetében. A fluvasztatin teljes gátlást okozott a vizsgált *C. albicans* izolátum esetében 32 µg/ml-es koncentrációban. A *C. glabrata* izolátum 100%-os gátlását 64 µg/ml-es koncentrációban váltotta ki a fluvasztatin. Az atorvasztatinnal és lovasztatinnal végzett kísérletekben a teljes gátlás eléréséhez szükséges koncentráció *C. albicans*-nál 128 és 64 µg/ml-nek bizonyult, míg *C. glabrata*-nál a teljes gátlást mindkét sztatín a 128 µg/ml-es koncentrációban váltotta ki. A roszuvasztatin mindkét izolátumot teljesen gátolta 128 µg/ml-es koncentrációban. A legkevésbé hatékonynak a pravasztatin bizonyult, mely a legmagasabb vizsgált koncentrációban (128 µg/ml) sem gátolta a vizsgálatba bevont törzseket.

A kombinációs vizsgálatokban minden antifungális szer esetében ki lehetett mutatni jelentősebb additív és szinergista kombinációkat sztatínokkal. A nystatin és az amfotericin B esetében egyedül a pravasztatinnal történő kombinációk bizonyultak hatástalannak. Az azolok esetében a ketokonazol/sztatín kombinációkban a kölcsönhatások jelentősen megnövelték az antifungális szer hatékonyságát mindkét vizsgált izolátum esetében. Egyedül a pravasztatin bizonyult hatástalannak *C. albicans* esetében. A flukonazollal végzett kombinációs kísérletekben szintén jelentős hatásnövekedéseket lehetett megfigyelni minden vizsgált kombinációban, a pravasztatin kivételével. Ez a megfigyelés az itraconazollal végzett kombinációkra is igaznak bizonyult. A primycinnel végzett kísérletekben a lovasztatin, a szimvasztatin, a fluvasztatin és az atorvasztatin bizonyultak a leghatásosabb interakciós partnereknek. Az együtthatásoknak köszönhetően a primycin teljes gátlást előidéző koncentrációja átlagosan egy hígítási lépcsővel csökkent.

Ezekre a megfigyelésekre alapozva célul tűztük ki további három *Candida* faj vizsgálatát, kiegészítve a felhasznált antifungális szereket a terbinafinnal és a grizeofulvinnal.

### **5.3.2. A szerek minimális gátló koncentrációinak (MIC) megállapítása**

A sztatínokkal és antifungális szerekkel történő kölcsönhatás vizsgálatok előtt mikrodilúciós módszerrel meghatároztuk az egyes szerek minimális gátló koncentrációját (MIC<sub>50</sub> és MIC) *Candida parapsilosis* CBS 604, *Candida guilliermondii* CBS 566 és *Candida*

*tropicalis* C

BS 94 izolátumok esetében. A MIC<sub>50</sub>-értékek a vizsgált izolátum növekedésének 50%-os gátlását jelentik, a MIC-értékek a teljes gátlásra vonatkoznak. A **10-12. Táblázat** a 48 óra elteltével kapott gátlási koncentrációkat tartalmazza.

A *Candida parapsilosis* a természetben igen elterjedt élesztő, könnyen izolálható tengerből, földmintákból és növényekről. Az emberi bőr kommenzalistája és természetes módon megtalálható a tápcsatorna nyálkahártyáin (Trofa és mtsai., 2008). A *C. albicans* után általában a harmadik leggyakrabban izolált patogén *Candida* faj (van Asbeck és mtsai., 2009) és számos megbetegedésért tehető felelőssé a bőr fertőzéseitől a szisztémás fertőzésekig.

**10. Táblázat.** Az antifungális szerek és sztatinok MIC-értékei a vizsgált *Candida parapsilosis* CBS 604 törzs esetében.

<i>Candida parapsilosis</i> CBS 604		
Antifungális szer	MIC <sub>50</sub>	MIC
Amfotericin B	0,5-1 µg/ml	2 µg/ml
Flukonazol	0,5-1 µg/ml	2 µg/ml
Itrakonazol	< 0,015 µg/ml	< 0,015 µg/ml
Grizeofulvin	> 64 µg/ml	> 64 µg/ml
Ketokonazol	< 0,03 µg/ml	< 0,03 µg/ml
Nystatin	2-4 µg/ml	4 µg/ml
Terbinafin	0,5-1 µg/ml	2 µg/ml
Primycin	16-32 µg/ml	32 µg/ml
Sztatin	MIC <sub>50</sub>	MIC
Lovasztatin	>128 µg/ml	>128 µg/ml
Szimvasztatin	16-32 µg/ml	64 µg/ml
Fluvasztatin	32-64 µg/ml	64 µg/ml
Atorvasztatin	>128 µg/ml	>128 µg/ml
Roszuvasztatin	>128 µg/ml	>128 µg/ml
Pravasztatin	>128 µg/ml	>128 µg/ml

Szakirodalmi adatok alapján a *Candida parapsilosis* izolátumok általában érzékenyek bizonyulnak azokkal szemben (Flückiger és mtsai., 2006, Al-Abeid és mtsai., 2004, Trofa és mtsai., 2008). Az általunk elvégzett kísérletekben a leghatásosabb antifungális szernek az itrakonazol és a ketokonazol bizonyult, ez a két szer már a vizsgált legkisebb koncentrációban teljes gátlást okozott, míg a flukonazol MIC-értékét 2 µg/ml-ben állapítottuk meg (**10. Táblázat**). Az amfotericin B esetében a 100%-os gátlás eléréséhez szükséges koncentráció szintén 2 µg/ml-nek bizonyult, ami a szakirodalmi adatokban szereplő 0,125-4 µg/ml-es tartománnyal összhangban van (de Toro és mtsai., 2011, Yang és mtsai., 2004). A nystatin hatékonynak bizonyult a vizsgált izolátummal szemben, bár a teljes gátláshoz szükséges

koncentráció magasabb volt (4 µg/ml) mint az amfotericin B esetében. A terbinafin szintén képes volt teljes mértékben gátolni a *C. parapsilosis* növekedését, a MIC-érték eléréséhez szükséges koncentráció 2 µg/ml-nek bizonyult. A legkevésbé hatékony antifungális szernek a grizeofulvin bizonyult. Ez a megfigyelés összhangban van egyéb kutatócsoportok eredményeivel (Upton és mtsai., 2004, Vanden Bossche és mtsai., 2003). Az általunk vizsgált koncentráció-tartományban nem volt lehetséges még a MIC<sub>50</sub>-érték megállapítása sem. A primycin MIC-értékei hasonlóknak bizonyultak a korábban laboratóriumunkban tesztelt *C. albicans* és *C. glabrata* esetében tapasztaltakhoz (Nyilasi és mtsai., 2010a).

*C. parapsilosis* esetében egyedül a fluvasztatin hatását vizsgálták korábban (Chin és mtsai., 1997). Az általuk kapott MIC-érték megközelítőleg egy hígítási lépcsővel magasabb volt (64-128 µg/ml) a laboratóriumunkban mértnél. A lovasztatin, szimvasztatin, atorvasztatin, roszuvasztatin és a pravasztatin vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált koncentráció-tartományban (0,25-128 µg/ml) a szimvasztatin kivételével egyik sem bizonyult hatásosnak. A MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges szimvasztatin-koncentráció 16 és 32 µg/ml közé esett, ami egy hígítási lépcsővel alacsonyabb, mint a fluvasztatin esetében, a MIC-érték azonban azonosnak bizonyult.

A *Candida guilliermondii* (teleomorf alakja *Pichia guilliermondii*) a *C. parapsilosis*-hoz hasonlóan a természetben igen elterjedt faj, könnyen izolálható talajból és növényi eredetű mintákból (Savini és mtsai., 2010a). Korábban elsősorban állati kórokozóként tartották számon, de az emberi mikrobióta részét is képezi. Megtalálható a bőrön és a tápcsatorna nyálkahártyáin. Az 1990-es évekig csak néhány általa okozott fertőzés volt ismeretes, az utóbbi évtizedekben azonban megnőtt az esetek száma, főleg a latin-amerikai országokban (Pfaller és mtsai., 2006b). Elsősorban a bőr és a köröm gombás fertőzése miatt tehető felelőssé, de okozhat kandidémiát, szívbelhártya-gyulladást és csontvelőgyulladást is (Savini és mtsai., 2010b).

A leghatékonyabb szernek a ketokonazol bizonyult a *C. guilliermondii*-val szemben: a legalacsonyabb (0,03 µg/ml) általunk vizsgált koncentráció is teljes gátlást eredményezett. Az itrakonazol szintén hatékonyan gátolta a vizsgált izolátumot (MIC=0,125 µg/ml) a vizsgált koncentrációkban, ami összhangban van a szakirodalomban leírtakkal (Girmenia és mtsai., 2006, Barchiesi és mtsai., 1999). Ryder és mtsai. (1998) a terbinafin MIC<sub>50</sub>-értékét 2 µg/ml-ben állapították meg és az általuk vizsgált nyolc izolátum egyikénél sem tapasztaltak 100%-os gátlást még 128 µg/ml-es koncentrációban sem (**11. Táblázat**). Az általunk vizsgált *C. guilliermondii* esetében a 2 µg/ml-es koncentrációban alkalmazott terbinafin már 100%-os gátlást ért el. Az amfotericin B és a nystatin teljes gátlást okozott 4 µg/ml-es koncentrációban,

ami a szakirodalomban fellelhető adatoknál (0,125-1 µg/ml) magasabb koncentráció (Savini és mtsai., 2010b, Girmenia és mtsai., 2006, Barchiesi és mtsai., 1999). A flukonazzal szemben kevésbé mutatkozott érzékenynek az általunk vizsgált izolátum (MIC=16 µg/ml), ami a szakirodalmi adatokkal összhangban van (Cuenca-Estrella és mtsai., 2000, Barchiesi és mtsai., 1999). A primycin 100%-os gátlást okozott 32 µg/ml-es koncentrációban, ami megegyezett a laboratóriumunkban korábban vizsgált *C. glabrata* izolátum érzékenységeivel (Nyilasi és mtsai., 2010a). A szakirodalmi adatoknak megfelelően a grizeofulvin nem bizonyult hatékonynak, még a legmagasabb koncentrációban sem gátolta számottevően a *C. guilliermondii* növekedését.

**11. Táblázat.** Az antifungális szerek és sztatinok MIC-értékei a vizsgált *Candida guilliermondii* CBS 566 törzs esetében.

<i>Candida guilliermondii</i> CBS 566		
<b>Antifungális szer</b>	<b>MIC<sub>50</sub></b>	<b>MIC</b>
Amfotericin B	2-4 µg/ml	4 µg/ml
Flukonazol	4-8 µg/ml	16 µg/ml
Itrakonazol	0,03-0,06 µg/ml	0,125 µg/ml
Grizeofulvin	> 64 µg/ml	> 64 µg/ml
Ketokonazol	<0,03 µg/ml	< 0,03 µg/ml
Nystatin	1-2 µg/ml	4 µg/ml
Terbinafin	1-2 µg/ml	2 µg/ml
Primycin	16-32 µg/ml	32 µg/ml
<b>Sztatin</b>	<b>MIC<sub>50</sub></b>	<b>MIC</b>
Lovasztatin	>128 µg/ml	>128 µg/ml
Szimvasztatin	32-64 µg/ml	128 µg/ml
Fluvasztatin	32-64 µg/ml	64 µg/ml
Atorvasztatin	>128 µg/ml	>128 µg/ml
Roszuvasztatin	>128 µg/ml	>128 µg/ml
Pravasztatin	>128 µg/ml	>128 µg/ml

A vizsgált *C. guilliermondii* izolátum a szimvasztatinra és a fluvasztatinra bizonyult a legérzékenyebbnek, ezek esetében lehetőségünk volt a 100%-os gátlás eléréséhez szükséges sztatin-koncentrációk megállapítására is. A további vizsgált sztatinok esetében, az 50%-os gátlás eléréséhez szükséges koncentráció is magasabbnak bizonyult, mint 128 µg/ml.

A *Candida tropicalis* a trópusi területeken a fertőzéseket okozó nem-albicans fajok közül a második leggyakrabban izolálható faj (Kothavade és mtsai., 2010). Az utóbbi évtizedekben jelentősen megemelkedett az általa okozott fertőzések száma, elsősorban a trópusi országokban, de világviszonylatban is. A *C. albicans*-tól eltérően természetes módon megtalálható a talajban. Számos emberi megbetegedésért tehető felelőssé, okozhatja a bőr és a

nyálkahártyák, a hüvely és a vizeletkiválasztó rendszer fertőzését, kandidémiát, a szívbelhártya gyulladását és agyhártyagyulladást is (Chai és mtsai., 2010).

**12. Táblázat.** Az antifungális szerek és szttatinok MIC-értékei a vizsgált *Candida tropicalis* CBS 94 törzs esetében.

<i>Candida tropicalis</i> CBS 94		
<b>Antifungális szer</b>	<b>MIC<sub>50</sub></b>	<b>MIC</b>
Amfotericin B	0,5-1 µg/ml	4 µg/ml
Flukonazol	32-64 µg/ml	> 64 µg/ml
Itrakonazol	0,015-0,03 µg/ml	2 µg/ml
Grizeofulvin	> 64 µg/ml	> 64 µg/ml
Ketokonazol	0,06-0,125 µg/ml	8 µg/ml
Nystatin	0,5-1 µg/ml	2 µg/ml
Terbinafin	2-4 µg/ml	8 µg/ml
Primycin	8-16 µg/ml	16 µg/ml
<b>Sztatin</b>	<b>MIC<sub>50</sub></b>	<b>MIC</b>
Lovasztatin	64-128 µg/ml	>128 µg/ml
Szimvasztatin	16-32 µg/ml	128 µg/ml
Fluvasztatin	32-64 µg/ml	64 µg/ml
Atorvasztatin	>128 µg/ml	>128 µg/ml
Roszuvasztatin	>128 µg/ml	>128 µg/ml
Pravasztatin	>128 µg/ml	>128 µg/ml

Az általunk vizsgált izolátum flukonazzal szemben rezisztensnek bizonyult, nem sikerült 100%-os növekedésgátlást elérni még 64 µg/ml-es koncentrációban sem. A szakirodalmi adatok alapján egyre több flukonazol-rezisztens *C. tropicalis* izolátum jelenik meg (Law és mtsai., 1996, Kothavade és mtsai., 2010). A rezisztencia hátterében feltehetően az *ERG11* génben bekövetkezett mutáció és egy multidrog efflux pumpát kódoló gén túlműködése van, hasonlóan a *C. albicans*-nál tapasztaltakhoz. A leghatékonyabb antifungális szernek az itraconazol és a nystatin bizonyult, a MIC-értéket 2 µg/ml-es koncentrációnál állapítottuk meg (**12. Táblázat**). Az amfotericin B 100%-os gátláshoz szükséges koncentrációját 4 µg/ml-ben állapítottuk meg. A grizeofulvin egyetlen vizsgált koncentrációban sem gátolta a kísérletbe bevont *C. tropicalis* izolátumot. A terbinafin kapcsán Ryder és munkatársai (1998) huszonhat *C. tropicalis* izolátumot megvizsgálva mind a MIC<sub>50</sub>-t, mind a MIC-érték eléréséhez szükséges koncentrációt magasabbnak állapították meg, mint 128 µg/ml. Cantón és munkatársai (2005) öt izolátum vizsgálata alapján magasabbnak találták a 100%-os gátláshoz szükséges koncentrációt, mint 16 µg/ml. Az általunk vizsgált törzs esetében azonban már a 8 µg/ml-es koncentrációban alkalmazott terbinafin is 100%-os gátlást okozott. A ketokonazol MIC-értékét 8 µg/ml-es koncentrációban

állapítottuk meg. A primycin hatékonyabb antifungális hatást fejtett ki mint, amit *C. parapsilosis*-nál és *C. guilliermondii*-nál tapasztaltunk; már 16 µg/ml-es koncentrációban teljes gátlást értünk el.

A sztatinok *C. tropicalis*-ra kifejtett hatásáról kevés irodalmi adat található, egyedül a fluvasztatin hatását vizsgálták (Chin és mtsai., 1997). Az általuk kapott MIC-érték megközelítőleg egy hígítási lépcsővel magasabb volt (64-128 µg/ml) a laboratóriumunkban mértnél. Megvizsgáltuk további öt sztatin MIC-értékeit és azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált koncentráció-tartományban (128–0,25 µg/ml) a szimvasztatin és a lovasztatin kivételével egyik sem bizonyult hatásosnak. A MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges szimvasztatin-koncentráció 16 és 32 µg/ml közé esett, ami egy hígítási lépcsővel alacsonyabb koncentráció, mint a fluvasztatin esetében; azonban a 100%-os gátlás eléréséhez szükséges szimvasztatin-koncentráció egy lépcsővel magasabbnak, 128 µg/ml-nek bizonyult. Lovasztatin esetében sikerült a vizsgált koncentráció-tartományon belül meghatározni a MIC<sub>50</sub>-értéket, mely a 64-128 µg/ml-es koncentrációk között található.

### 5.3.3. Az antifungális szerek és sztatinok kölcsönhatásainak vizsgálata *C. parapsilosis* CBS 604 esetében

#### 5.3.3.1. Az amfotericin B kombinálása sztatinokkal (13. Táblázat)

**13. Táblázat.** A legjelentősebb amfotericin B/sztatin kombinációk.

Kombináció	Antifungális szer (µg/ml)	Sztatin (µg/ml)	Átlag IR	Kölcsönhatás típusa	Gátlás mértéke (%)
AMB/ SZIM	0,5	0,39	1,6	SZIN	58±3,9%
AMB/ FLUV	1	0,39	1,9	SZIN	96±0,7%
	0,125	0,39	1,9	SZIN	52±4,6%
AMB/ ATOR	1	6,25	1,7	SZIN	99±1,1%
	0,25	25	1,9	SZIN	64±2,8%
AMB/ ROSU	1	25	1,6	SZIN	79±1,8%

Az amfotericin B/szimvasztatin kombinációt szinergista és additív kölcsönhatások jellemezték. A MIC-érték nem változott, azonban a szinergista együttműködések hatására a MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges amfotericin B-koncentráció 0,5-1 µg/ml-ről 0,25-0,5 µg/ml-re csökkent már 0,39 µg/ml-es sztatin-koncentrációnál is. A szimvasztatin önmagában is képes volt kis mértékben gátolni a növekedést a legmagasabb (25 µg/ml) koncentrációban (**1. Melléklet**).

Az amfotericin B-t kombinálva fluvasztatinnal számos szinergista kölcsönhatást figyelhattunk meg. Ezek a kölcsönhatások a teljes gátlás eléréséhez szükséges amfotericin B-koncentrációt 2 µg/ml-ről megközelítőleg 1 µg/ml-re, a MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges koncentrációt pedig három lépcsővel, 0,5-1 µg/ml-ről 0,06-0,125 µg/ml-re csökkentették. A 25 µg/ml-es sztatin-koncentrációnál a kölcsönhatások additívvá váltak, de ezek nem befolyásolták jelentősen az antifungális szer önmagában kifejtett hatását (**2. Melléklet**).

Az amfotericin B/atorvasztatin kölcsönhatásokat jelentős szinergista interakciók jellemezték. A 100%-os gátlás eléréséhez szükséges amfotericin B-koncentráció egy

lépcsővel 2 µg/ml-ről 1 µg/ml-re, míg a MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges koncentráció 0,5-1 µg/ml-ről 0,125-0,25 µg/ml-re csökkent (**3. Melléklet**).

Az amfotericin B-t roszuvasztatinnal kombinálva túlnyomórészt szinergista hatásokat figyeltünk meg. A szinergista kombinációk jelentősen megnövelték az antifungális szer hatását, de ezek nem eredményezték egyértelműen a MIC- és MIC<sub>50</sub>-értékek eltolódását. Az antifungális szer 1 µg/ml-es koncentrációjánál és magasabb (1,56-25 µg/ml) roszuvasztatin-koncentrációknál a gátlási százalék az eredeti 54%-ról 74-79%-ra emelkedett (**4. Melléklet**).

Az amfotericin B/pravasztatin kölcsönhatások főként szinergisták és additívak voltak. Néhány szinergista kombinációban jelentősebb hatásnövekedést lehetett tapasztalni, de ezek nem okozták a MIC-érték eltolódását. Az 1 µg/ml-es amfotericin B-koncentrációnál a szer önmagában kifejtett gátló hatása 51%-os értékről a növekvő sztatin-koncentrációval folyamatosan 60-70%-ra emelkedett.

Az amfotericin B/lovasztatin kölcsönhatások elsősorban additívnak bizonyultak, de nem befolyásolták lényegesen az antifungális szer önmagában kifejtett hatását. A MIC-értékek változatlanok maradtak, azonban 1 µg/ml-es amfotericin B-koncentrációnál a szer önmagában kifejtett gátló hatása 51 százalékról közel 70%-ig emelkedett a növekvő lovasztatin-koncentrációval párhuzamosan.

#### **5.3.3.2. A flukonazol kombinálása sztatínokkal (14. Táblázat)**

A flukonazol/szimvasztatin együttes alkalmazásakor elsősorban additív kombinációkat figyeltünk meg, melyek hatására a 100%-os gátlás eléréséhez szükséges flukonazol-koncentráció 2 µg/ml-ről közel 1 µg/ml-re csökkent 25 µg/ml-es szimvasztatinnal együttthva. Ebben a koncentrációban a szimvasztatin önmagában is képes volt kisebb mértékű gátlás kifejtésére (**5. Melléklet**).

A flukonazol fluvasztatinnal kombinálva a kölcsönhatások főként additívnak bizonyultak. Az 1 µg/ml-es koncentrációban a flukonazol önmagában kifejtett 79%-os gátló hatása 25 µg/ml-es koncentrációjú fluvasztatin együttes alkalmazásával 100%-ra emelkedett. A MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges antifungális szer koncentráció szintén egy lépcsővel, 0,25-0,5 µg/ml-re csökkent (**6. Melléklet**).



**14. Táblázat.** A legjelentősebb flukonazol/sztatin kombinációk.

Kombináció	Antifungális szer (µg/ml)	Sztatin (µg/ml)	Átlag IR	Kölcsönhatás típusa	Gátlás mértéke (%)
FLUK/ SZIM	1	25	1,5	ADD	94±2,1%
FLUK/ FLUV	1	25	1,2	ADD	100%
	0,5	25	1,6	SZIN	65±3,3%
FLUK/ ATOR	1	25	1,2	ADD	93±1,0%

A flukonazol/atorvasztatin kombinációban a flukonazol hatása dominált, a kölcsönhatások egy additív kombináció kivételével nem befolyásolták számottevően az antifungális szer önmagában kifejtett hatását. Ez a hatás 1 µg/ml-es flukonazol- és 25 µg/ml-es atorvasztatin-koncentráció mellett a flukonazol eredeti 78%-os gátló hatását 93%-ra emelte **(7. Melléklet)**.

A flukonazol pravasztatinnal, roszuvasztatinnal és lovasztatinnal kombinálva nem sikerült jelentős kölcsönhatásokat megfigyeni. A flukonazol hatása dominált, a sztatinok a vizsgált koncentrációkban nem okoztak jelentősebb változást az antifungális szer gátló hatásában.

**5.3.3.3. A grizeofulvin, itraconazol és ketokonazol kombinálása sztatinokkal**

A grizeofulvin/sztatin kombinációkban nem tudtunk kölcsönhatásokat megfigyelni, mivel a grizeofulvin nem volt képes gátolni a vizsgált *C. parapsilosis* izolátumot. A sztatinokkal történő kombinációkat főként a semleges kölcsönhatások jellemezték, és egyetlen variációban sem volt megfigyelhető a grizeofulvin antifungális hatásának olyan arányú megnövekedése, mely befolyásolta volna a szer gátló hatását. Antagonista kölcsönhatásokat nem tapasztaltunk a két szer között.

Az itraconazol/sztatin kombinációkban minden esetben az itraconazol hatása érvényesült. Az antifungális szer az összes vizsgált koncentrációban közel 100%-os gátló hatást fejtett ki. A legmagasabb, 25 µg/ml-es sztatin-koncentrációk használatával elvégzett kombinációkban sem tapasztaltunk antagonista, vagy egyéb hatást a két szer között.

A ketokonazol szttatinokkal történő kombinálása során minden esetben a ketokonazol hatása dominált. Antagonista kölcsönhatásokat egyetlen kombinációban sem sikerült megfigyelni.

#### 5.3.3.4. *A nystatin kombinálása szttatinokkal (15. Táblázat)*

A nystatin/fluvasztatin kombinációban elsősorban a nystatin hatása dominált, főként semleges kölcsönhatások jellemezték a kombinációt. A 2 µg/ml-es koncentrációjú nystatin önmagában 30%-os gátlást eredményezett, melyet a fluvasztatin széles koncentráció-tartományban (0,39-25 µg/ml) 50 és 60% közé emelt. Ezeknek a szinergista kölcsönhatásoknak köszönhetően a MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges nystatin-koncentráció 2-4 µg/ml-ről 1-2 µg/ml-re csökkent (8. Melléklet).

**15. Táblázat.** A legjelentősebb nystatin/sztatin kombináció.

Kombináció	Antifungális szer (µg/ml)	Sztatin (µg/ml)	Átlag IR	Kölcsönhatás típusa	Gátlás mértéke (%)
NYS/ FLUV	2	0,39	1,8	SZIN	54±1,9

A további szttatin kombinációk mindegyikében a nystatin hatása érvényesült. A kölcsönhatások semlegesnek bizonyultak. Egyetlen szttatin esetében sem lehetett jelentősebb additív, vagy szinergista kölcsönhatásokat kimutatni, melyek a nystatin antifungális hatásának jelentősebb megemelkedését okozták volna. Antagonizmust nem tapasztaltunk a vizsgált kombinációkban.

#### 5.3.3.5. *A terbinafin kombinálása szttatinokkal (16. Táblázat)*

A terbinafint szimvasztatinnal kombinálva elsősorban az antifungális szer hatásának dominanciáját tapasztaltuk, a kölcsönhatások főként semlegesnek bizonyultak. Egy szinergista kombináció és az additív kölcsönhatások a MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges terbinafin-koncentrációt 0,5-1 µg/ml-ről 0,25-0,5 µg/ml-re csökkentették a 6,25-25 µg/ml-es koncentráció-tartományban alkalmazott szimvasztatin mellett (9. Melléklet).

**16. Táblázat.** A legjelentősebb terbinafin/sztatin kombinációk.

Kombináció	Antifungális szer (µg/ml)	Sztatin (µg/ml)	Átlag IR	Kölcsönhatás típusa	Gátlás mértéke (%)
TER/SZIM	0,5	6,25	1,8	SZIN	59±1,1%
TER/FLUV	1	25	1,4	ADD	97±0,8%
	0,5	25	1,4	ADD	73±1,1%
TER/ATOR	0,5	0,39	1,6	SZIN	67±1,3%
TER/ROS	0,5	25	1,3	ADD	61%±3,2%
TER/PRA	0,5	25	1,3	ADD	65±1,7%

A terbinafin/fluvasztatin együtthatásának vizsgálata során a terbinafin dominanciáját tapasztaltuk, főként a semleges kölcsönhatások jellemezték a kombinációt. Az additív kölcsönhatások következtében a 100%-os gátláshoz szükséges terbinafin-koncentráció 2 µg/ml-ről közel 1 µg/ml-re csökkent 25 µg/ml-es fluvasztatin-koncentráció alkalmazása mellett. A MIC<sub>50</sub>-érték szintén egy lépcsővel 0,5-1 µg/ml-ről 0,25-0,5 µg/ml-re csökkent 25 µg/ml-es sztatin-koncentráció mellett **(10. Melléklet)**.

A terbinafin atorvasztatinnal történő kombinációira számos szinergista hatás volt jellemző, melyeknek köszönhetően az 50% os gátláshoz szükséges terbinafin-koncentráció egy lépcsővel 0,25-0,5 µg/ml-re volt csökkenthető. A 100%-os gátláshoz szükséges koncentráció nem változott **(11. Melléklet)**.

A terbinafin/roszuvasztatin kombinációban elsősorban a terbinafin hatása dominált és főként a semleges kölcsönhatások voltak jellemzőek. A 0,5 µg/ml-es koncentrációban a terbinafin gátló hatása 47%-ról a 25 µg/ml-es koncentrációban alkalmazott roszuvasztatin hatására 61%-ra emelkedett, ami a terbinafin MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges koncentrációját egy hígítási lépcsővel csökkentette **(12. Melléklet)**.

A pravasztatinnal történő kombináció esetében a kölcsönhatások elsősorban additívnak bizonyultak, melyek hatására MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges terbinafin-

koncentráció 0,5-1 µg/ml-ről 0,25-0,5 µg/ml-re volt csökkenthető. A 100%-os gátláshoz szükséges terbinafin-koncentrációt nem befolyásolták a kölcsönhatások **(13. Melléklet)**.

A lovasztatinnal történő kombinációkra az additív hatások voltak jellemzőek, de ezek egyike sem befolyásolta jelentősen a terbinafin antifungális hatását. A MIC-értékek változatlanok maradtak.

#### 5.3.3.6. A primycin kombinálása sztatinnal (17. Táblázat)

A primycin/szimvasztatin kombinációban a kölcsönhatások főként semlegesnek bizonyultak, azonban néhány jelentősebb szinergista kombinációt is megfigyeltünk. A 16 µg/ml-es primycin-koncentrációnál a szer önmagában alkalmazva már csak 6%-os gátlást eredményezett, de magasabb szimvasztatin-koncentrációk (6,25-25 µg/ml) esetén nagyfokú szinergizmus volt megfigyelhető. Ezek a hatások a gátlás hatékonyságát a sztatinkoncentrációjának emelkedésével 94%-ra fokozták. Az 50%-os gátlás eléréséhez szükséges primycin-koncentráció 16-32 µg/ml-ről 4-8 µg/ml-re csökkent **(14. Melléklet)**.

**17. Táblázat.** A legjelentősebb primycin/sztatinkombinációk.

Kombináció	Antifungális szer (µg/ml)	Sztatinkoncentráció (µg/ml)	Átlag IR	Kölcsönhatás típusa	Gátlás mértéke (%)
PRI/SZIM	16	25	3,2	SZIN	94±0,2%
	8	25	3,4	SZIN	85±0,5
PRI/FLUV	16	25	4,1	SZIN	96±0,8%
	8	25	3,8	SZIN	79±3,5%
PRI/ATOR	32	25	0,2	ANT	18±3,9%

A primycin fluvasztatinnal történő interakcióinak vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a kölcsönhatások főként semlegesek voltak, két kombinációban azonban jelentősen megemelkedett a primycin antifungális hatása. A 16 µg/ml-es primycin-koncentrációnál a szer önmagában már nem okozott jelentős gátlást, de 25 µg/ml-es fluvasztatinnal kombinálva jelentősen fokozódott a vizsgált izolátumra kifejtett gátló hatása. Ez a jelenség a 100%-os gátláshoz szükséges primycin-koncentrációt 32 µg/ml-ről közel 16 µg/ml-re csökkentette. A

MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges koncentráció szintén csökkent, 16-32 µg/ml-ről 4-8 µg/ml-re **(15. Melléklet)**.

A primycin/atorvasztatin kombináció során a kölcsönhatások főleg semlegesek voltak. Az esetleges additív és szinergista kombinációkban elért gátlások egyike sem haladta meg a 10%-ot, azonban 32 µg/ml-es primycin-koncentráció esetében a 25 µg/ml-es sztatin kombinációnál jelentős antagonizmus volt megfigyelhető **(16. Melléklet)**.

A lovasztatinnal, pravasztatinnal és roszuvasztatinnal elvégzett kombinációs kísérletek esetében a kölcsönhatások főként semlegesnek, vagy additívnak mutatkoztak. A primycin antifungális hatása érvényesült, a kombinációk nem okoztak számottevő változást a MIC-értékekben.

Az antifungális szerek és a sztatinek kombinációit összefoglalva, az amfotericin B esetében az atorvasztatin, míg a flukonazol esetében a fluvasztatin bizonyult a leghatásosabb interakciós partnernek. A terbinafin és a primycin esetében szintén a fluvasztatin volt képes a leginkább növelni az antifungális szer hatékonyságát. A primycin/atorvasztatin kombinációban antagonista kölcsönhatásokat figyeltünk meg.

#### 5.3.4. Az antifungális szerek és sztatinok kölcsönhatásainak vizsgálata *C. guilliermondii* CBS 566 esetében

##### 5.3.4.1. Az amfotericin B kombinálása sztatinokkal (18. Táblázat)

A lovasztatin kombinációban a kölcsönhatások főként additívnak bizonyultak, de ezek nem befolyásolták jelentősen az antifungális szer önmagában mért hatását. Néhány szinergista kombinációban azonban számottevő hatásnövekedést figyelhettünk meg. A 2 µg/ml-es amfotericin B- és 3,125-25 µg/ml-es lovasztatin-koncentrációk esetében a gátlási százalék közel 60%-ra nőtt. Ezek a kölcsönhatások az amfotericin B esetében a MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges koncentrációt egy hígítási lépcsővel 1-2 µg/ml-re csökkentették (17. Melléklet).

Az amfotericin B/szimvasztatin kombinációban főként az amfotericin B hatása dominált. A szinergista kombinációk hatására a 2 µg/ml-es amfotericin B-koncentrációnál és 0,39-25 µg/ml-es szimvasztatin-koncentrációknál jelentős hatásnövekedés volt megfigyelhető. Az amfotericin B önmagában alkalmazva 21% gátlást ért el, míg szimvasztatinnal kombinálva átlagosan 80% volt a gátlás mértéke. A MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges amfotericin B-koncentráció 2-4 µg/ml-ről 1-2 µg/ml-re volt csökkenthető 0,39-25 µg/ml-es sztatin-koncentrációk alkalmazása mellett. Az 1 µg/ml-es amfotericin B-koncentrációnál alacsonyabb tartományban nem tapasztaltunk jelentős kölcsönhatásokat, a szerek külön-külön és kombinációban sem gátolták a növekedést (18. Melléklet).

**18. Táblázat.** A legjelentősebb amfotericin B/sztatin kombinációk.

Kombináció	Antifungális szer (µg/ml)	Sztatin (µg/ml)	Átlag IR	Kölcsönhatás típusa	Gátlás mértéke (%)
AMB/LOV	2	3,125	4,8	SZIN	59±4,5%
AMB/SZIM	2	25	2,5	SZIN	78±0,3%
	2	0,39	3,1	SZIN	63±1,2
AMB/ATOR	2	0,78	6,2	SZIN	100%
	2	0,39	5,9	SZIN	93±1,1%
AMB/ROSU	2	25	6,1	SZIN	84±1,7%
	2	1,56	5,7	SZIN	74±1,2%

Az amfotericin B atorvasztatinnal történő kombinációjára szintén számos szinergista kölcsönhatás volt jellemző. Ezek a kölcsönhatások 2 µg/ml-es amfotericin B-koncentráció és 0,78-25 µg/ml-es atorvasztatin-koncentrációk alkalmazásával 100%-os gátlást eredményeztek. Az amfotericin B MIC<sub>50</sub>-értéke a szimvasztatin kombinációban tapasztaltakhoz hasonlóan szintén egy lépcsővel 2-4 µg/ml-ről 1-2 µg/ml-re csökkent **(19. Melléklet)**.

Az amfotericin B/roszuvasztatin kombinálása során megfigyelt fontosabb kölcsönhatások túlnyomórészt szinergistának bizonyultak. A 2 µg/ml-es amfotericin B-koncentráció mellett a 1,56 µg/ml-től 25 µg/ml-ig terjedő roszuvasztatin-koncentrációkban jelentős szinergizmust tapasztaltunk. Ezekben a koncentrációkban az antifungális szer önmagában alkalmazott gátlása 7%-ról fokozatosan 80-85%-ra emelkedett. A MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges antifungális szer koncentráció 2-4 µg/ml-ről 1-2 µg/ml-re csökkent. Az 1 µg/ml alatti koncentrációkban az amfotericin B nem gátolta a vizsgált izolátumot, és a kölcsönhatások sem okoztak jelentős emelkedést. A roszuvasztatin önmagában nem volt képes gátolni a növekedést **(20. Melléklet)**.

Az amfotericin B-t fluvasztatinnal kombinálva elsősorban a semleges kölcsönhatások voltak jellemzőek, az antifungális szer hatása dominált. A vizsgált koncentrációkban a fluvasztatin nem gátolta jelentősen a vizsgált izolátum növekedését. A 2 µg/ml-es amfotericin B-koncentrációnál szinergista kölcsönhatások voltak megfigyelhetőek, de ezek nem befolyásolták jelentős mértékben a gátlás mértékét.

Az amfotericin B/pravasztatin kombinációban főként semleges kölcsönhatásokat figyelhattunk meg, az amfotericin B hatása érvényesült.

#### **5.3.4.2. A flukonazol kombinálása sztatínokkal (19. Táblázat)**

A flukonazol/szimvasztatin kombinációt 8 és 4 µg/ml-es antifungális szer koncentrációnál jelentős hatású additív és szinergista együttműködések jellemezték. Az additív kombinációk hatására a MIC-érték eléréséhez szükséges flukonazol-koncentráció 16 µg/ml-ről 8 µg/ml-re csökkent már 0,39 µg/ml-es szimvasztatin-koncentrációnál is, továbbá 4 µg/ml-es antifungális szer- és magasabb (25-3,125 µg/ml) szimvasztatin-koncentrációknál is 90% feletti gátlást tapasztaltunk. A 2 µg/ml-es, vagy annál alacsonyabb flukonazol-koncentrációkban a gátlás mértéke lecsökkent, kölcsönhatásokat nem tapasztaltunk **(21. Melléklet)**.

**19. Táblázat.** A legjelentősebb flukonazol/sztatin kombinációk.

Kombináció	Antifungális szer (µg/ml)	Sztatin (µg/ml)	Átlag IR	Kölcsönhatás típusa	Gátlás mértéke (%)
FLUK/ SZIM	8	0,39	1,3	ADD	100%
	4	3,125	3,2	SZIN	95±4,2%
FLUK/ FLUV	8	0,78	1,4	ADD	100%
	4	25	3,3	SZIN	100%
	2	25	2,0	SZIN	64±0,7%
FLUK/ ATOR	4	25	1,4	ADD	57±0,8%
	4	0,78	1,3	ADD	53±1,9%

A flukonazol/fluvasztatin kombinációt additív és szinergista kölcsönhatások egyaránt jellemezték, melyek emelkedést okoztak a növekedésgátlásban. Az additív hatásoknak köszönhetően 8 µg/ml-es amfotericin B-koncentrációnál az eredetileg 69%-os gátlás már 0,78 µg/ml-es sztatin-koncentrációnál is 100%-ra emelkedett. Kettő kiemelkedő szinergista hatást is meg lehetett figyelni a két szer között 4 µg/ml-es antifungális szer koncentrációknál, ahol az eredetileg 20%-os gátlás 12,5 és 25 µg/ml-es sztatin-koncentrációnál 73 illetve 100%-os értékre nőtt. A 2 µg/ml-es flukonazol-koncentrációnál a legmagasabb alkalmazott sztatin-koncentráció 21%-ról 64% százalékra növelte az antifungális szer hatékonyságát **(22. Melléklet)**.

A flukonazol/atorvasztatin kombináció vizsgálata során a flukonazol dominanciáját tapasztaltuk, főként semleges kölcsönhatások jellemezték a kombinációt. Az additív kölcsönhatásoknak köszönhetően az antifungális szer MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges koncentrációja 4-8 µg/ml-ről 2-4 µg/ml-re csökkent. A sztatin önmagában alkalmazva nem okozott gátlást **(23. Melléklet)**.

A flukonazol/pravasztatinnal, roszuvasztatinnal vagy lovasztatinnal kombinálva főként semleges hatásokat tapasztaltunk. A flukonazol hatása érvényesült, a három sztatin egyetlen koncentrációban sem okozta az antifungális szer hatásának megemelkedését.



#### 5.3.4.3. A grizeofulvin kombinálása sztatinnal

A grizeofulvin egyetlen sztatinnal kombinálva sem okozott 30%-nál nagyobb növekedésgátlást a vizsgált izolátum esetében. A kölcsönhatások elsősorban semlegesnek bizonyultak. A legjelentősebb hatást a grizeofulvin/lovasztatin kombinációban tapasztaltuk, ahol 64 µg/ml-es grizeofulvin- és 25 µg/ml-es lovasztatin-koncentrációknál 27% gátlást ért el a két szer. Ezek alatt a koncentrációk alatt a gátlás elenyészőre csökkent.

#### 5.3.4.4. Az itraconazol kombinálása sztatinnal (20. Táblázat)

Az itraconazol/lovasztatin kombinációban az itraconazol hatása dominált. Az antifungális szer 0,06 µg/ml-es koncentrációban önmagában 65%-os gátlást okozott, de az additív kölcsönhatásoknak köszönhetően a sztatín-koncentráció emelkedésével ez az érték fokozatosan 95%-ra emelkedett. Alacsonyabb itraconazol-koncentrációkban nem voltak jelentős eltérések a kombinációk hatására (24. Melléklet).

**20. Táblázat.** A legjelentősebb itraconazol/sztatín kombinációk.

Kombináció	Antifungális szer (µg/ml)	Sztatín (µg/ml)	Átlag IR	Kölcsönhatás típusa	Gátlás mértéke (%)
ITR/LOV	0,06	25	1,4	ADD	95%±2,0%
ITR/SZIMV	0,06	0,39	1,4	ADD	98±1,5%
	0,015	25	3,1	SZIN	70±5,6%
ITR/FLUV	0,06	25	1,1	ADD	97±2,6
	0,03	25	1,9	SZIN	56±0,9
ITR/ATOR	0,06	0,39	1,2	ADD	93±5,4%
	0,03	3,125	3,5	SZIN	100%
	0,015	3,125	5,3	SZIN	100%

Az itraconazol/szimvasztatin kombinációt jelentős additív és szinergista kölcsönhatások jellemezték. Az additív hatások következtében a 100%-os gátlás eléréséhez

szükséges itraconazol-koncentráció 0,125 µg/ml-ről 0,03 µg/ml-re volt csökkenthető. A szinergista hatásoknak köszönhetően 0,015 µg/ml-es antifungális szer használatával is 70% gátlást értünk el 25 µg/ml-es szimvasztatin-koncentráció mellett **(25. Melléklet)**.

Az itraconazol/fluvasztatin kombinációban elsősorban az itraconazol hatása dominált, főként semleges kölcsönhatások jellemezték a kombinációt. Egy jelentősebb szinergista kölcsönhatás volt tapasztalható, mely a MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges itraconazol-koncentrációt 0,03-0,06 µg/ml-ről 0,015-0,3 µg/ml-re csökkentette. Egy additív hatásnak köszönhetően az antifungális szer 100%-os gátláshoz szükséges koncentrációja is közel egy lépcsővel, 0,125 µg/ml-ről 0,06 µg/ml-re volt csökkenthető 25 µg/ml-es fluvasztatin-koncentráció mellett **(26. Melléklet)**.

Az itraconazol/atorvasztatin kombinációt főként szinergista és additív kölcsönhatások jellemezték. A szinergista hatások következtében már 0,015 µg/ml-es itraconazol-koncentráció is 100%-os gátlást eredményezett 3,125-25 µg/ml-es atorvasztatin-koncentrációk mellett **(27. Melléklet)**.

Az itraconazol pravasztatinnal, vagy roszuvasztatinnal kombinálva semleges hatásokat tapasztaltunk. Az itraconazol hatása dominált, a sztatinok hatására nem változott jelentősen az antifungális szer önmagában kifejtett hatása.

#### **5.3.4.5. A ketokonazol kombinálása sztatinokkal**

A ketokonazol az összes vizsgált koncentrációban teljesen gátolta az általunk vizsgált *C. guilliermondii* izolátumot, ezért nem nyílt lehetőségünk a sztatinokkal történő pozitív kombinációs kölcsönhatások kimutatására. Antagonizmust egyetlen esetben sem tapasztaltunk.

#### **5.3.4.6. A nystatin kombinálása sztatinokkal (21. Táblázat)**

A nystatin/lovasztatin kombinációra szintén a semleges kölcsönhatások voltak jellemzőek. Három additív kombináció volt megfigyelhető 6,25-25 µg/ml-es sztatin- és 2 µg/ml-es nystatin-koncentrációknál, melyek az önmagában alkalmazott nystatin 51%-os gátló hatását 60-63%-ra növelték **(28. Melléklet)**.

**21. Táblázat.** A legjelentősebb nystatin kombináció.

Kombináció	Antifungális Szer (µg/ml)	Sztatin (µg/ml)	Átlag IR	Kölcsönhatás típusa	Gátlás mértéke (%)
NYS/ LOV	2	6,25	1,1	ADD	60%±2,7%

A nystatin/fluvasztatin kombinációban a nystatin hatása dominált. Elsősorban semleges hatásokat figyeltünk meg, az additív és szinergista kölcsönhatások nem okozták a antifungális szer gátló hatásának jelentősebb eltolódását. A pravasztatin, roszuvasztatin, atorvasztatin és szimvasztatin kombinációkra szintén a nystatin dominanciája és a kölcsönhatások semlegessége volt jellemző.

#### **5.3.4.7. A terbinafin kombinálása sztatinokkal (22. Táblázat)**

A terbinafin/lovasztatin kombinációt főként additív kölcsönhatások jellemezték. A terbinafin hatását jelentősebben négy szinergista együtt hatás emelte meg. Ezeket 1 µg/ml-es antifungális szer- és 1,56-12,5 µg/ml-es sztatin-koncentrációknál tapasztaltuk. A kombinációk a terbinafin eredetileg 21%-os gátló hatását megközelítőleg 50-60%-ra emelték, melynek következtében a MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges terbinafin-koncentráció 1-2 µg/ml-ről 0,5-1 µg/ml-re volt csökkenthető. Magasabb sztatin-koncentrációknál (25 µg/ml) a gátlás hatékonysága lecsökkent, de a kölcsönhatások additívak maradtak (29. Melléklet).

A terbinafin/szimvasztatin kombinációt számos szinergista hatás jellemezte, melyek következtében a MIC<sub>50</sub>-érték egy lépcsővel, 1-2 µg/ml-ről 0,5-1 µg/ml-re volt csökkenthető. A terbinafin 1 µg/ml-es koncentrációja által okozott 33%-os gátló hatás a növekvő szimvasztatin-koncentrációk hatására fokozatosan 60% fölé emelkedett. Alacsonyabb terbinafin-koncentrációkban jelentősebb kölcsönhatásokat már nem figyeltünk meg (30. Melléklet).

**22. Táblázat.** A legjelentősebb terbinafin/sztatin kombinációk.

Kombináció	Antifungális szer (µg/ml)	Sztatin (µg/ml)	Átlag IR	Kölcsönhatás típusa	Gátlás mértéke (%)
TER/LOV	1	6,25	2,7	SZIN	60±4,4%
TER/SZIM	1	25	1,6	SZIN	64±6,0%
TER/FLUV	1	25	2,0	SZIN	72±3,7%
TER/ROSU	1	25	1,3	ADD	52±4,0%

A terbinafin/fluvasztatin kombinációban elsősorban a terbinafin hatása dominált, főként semleges kölcsönhatások jellemezték a kombinációt. A szinergista kölcsönhatások a MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges terbinafin-koncentrációt 1-2 µg/ml-ről 0,5-1 µg/ml-re csökkentették. Az 1 µg/ml-es koncentrációban a terbinafin önmagában 31% gátlást okozott, de a fluvasztatin-koncentráció emelkedésével fokozatosan nőtt a gátlási százalék, egészen 72%-ig (**31. Melléklet**).

A terbinafin/roszuvasztatin kombinációra az additív hatások voltak jellemzőek, melyek következtében a MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges terbinafin-koncentráció 0,39-25 µg/ml-es roszuvasztatin-koncentrációknál 1-2 µg/ml-ről 0,5-1 µg/ml-re volt csökkenthető. Az emelkedő sztatin-koncentrációk hatására a kezdeti 38%-os gátlás 57%-ra emelkedett (**32. Melléklet**).

A terbinafin pravasztatinnal vagy atorvasztatinnal történő kombinációira főként a semleges kölcsönhatások voltak jellemzőek, a terbinafin hatása dominált. Sem az additív, sem a szinergista hatások nem befolyásolták nagymértékben az antifungális szer gátló hatását.

**5.3.4.8. A primycin kombinálása sztatinokkal (23. Táblázat)**

A primycint szimvasztatinnal és fluvasztatinnal kombinálva számos additív kölcsönhatást figyelhettünk meg, de ezek nem befolyásolták jelentősen a primycin önmagában kifejtett hatását. A 32 µg/ml-es primycin- és 25 µg/ml-es sztatin-koncentrációknál

a szimvasztatin és a fluvasztatin esetében is erős antagonizmus volt megfigyelhető (33. és 34. Melléklet).

**23. Táblázat.** A legjelentősebb primycin/sztatin kombinációk.

Kombináció	Antifungális szer (µg/ml)	Sztatin (µg/ml)	Átlag IR	Kölcsönhatás típusa	Gátlás mértéke (%)
PRI/ SZIM	32	25	0,3	ANT	26±2,5%
PRI/ FLUV	32	25	0,4	ANT	37±7,2%
PRI/ ATOR	32	25	0,1	ANT	10±4,4%
		12,5	0,4	ANT	41±5,8%

A primycin/atorvasztatin kombinációra a semleges kölcsönhatások mellett a magas fokú antagonizmus volt jellemző. A 32 µg/ml-es primycin-koncentrációnál és 12-25 µg/ml-es atorvasztatin-koncentrációnál a primycin önmagában okozott 100%-os gátló hatása 41%-ra, majd 10%-ra esett. Ennél alacsonyabb koncentrációkban egyik szer sem volt képes jelentősen gátolni a növekedést, a kölcsönhatások sem okoztak jelentős változást a gátlásban (35. Melléklet).

A primycint lovasztatinnal, roszuvasztatinnal és pravasztatinnal kombinálva semleges kölcsönhatásokat figyelhattunk meg, a primycin antifungális hatása érvényesült.

A vizsgált *C. guilliermondii* CBS566 törzs esetében a leghatékonyabb kombinációk az az amfotericin B/atorvasztatin, a flukonazol/fluvasztatin és az itraconazol/atorvasztatin voltak. A primycin esetében a szimvasztatinnal, fluvasztatinnal és az atorvasztatinnal elvégzett kombinációs kísérletekben jelentős antagonizmust figyeltünk meg.

### 5.3.5. Az antifungális szerek és sztatínok kölcsönhatásainak vizsgálata *C. tropicalis* CBS 94 esetében

#### 5.3.5.1. Az amfotericin B kombinálása sztatínokkal (24. Táblázat)

Az amfotericin B/szimvasztatin kombinációt elsősorban additív kölcsönhatások jellemezték, melyek hatására a MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges amfotericin B-koncentráció 0,5-1 µg/ml-ről 0,03 µg/ml-re csökkent. A szimvasztatin önmagában is képes jelentősebb mértékben gátolni a növekedést (**36. Melléklet**).

Az amfotericin B/fluvasztatin kombinációra kizárólag additív kölcsönhatások voltak jellemzőek. A fluvasztatin magasabb koncentrációkban (12,5-25 µg/ml) önmagában is képes volt megközelítőleg 20%-os növekedésgátlást kifejteni. Az amfotericin B 4 µg/ml-es koncentrációban 100%-osan gátolta a vizsgált *C. tropicalis* izolátum növekedését, de kiegészítve 25 µg/ml-es koncentrációjú fluvasztatinnal a gátló hatás egy hígítási lépcsővel alacsonyabban is közel 100% maradt. Az additív hatások az antifungális szer MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges koncentrációját 0,5-1 µg/ml-ről 0,25-0,5 µg/ml-re csökkentették (**37. Melléklet**).

**24. Táblázat.** A legjelentősebb amfotericin B/sztatín kombinációk.

Kombináció	Antifungális szer (µg/ml)	Sztatín (µg/ml)	Átlag IR	Kölcsönhatás típusa	Gátlás mértéke (%)
AMB/ SZIM	0,03	25	0,9	ADD	52±1,1%
AMB/ FLUV	2	25	1,3	ADD	96±1,2%
AMB/ ATOR	1	12,5	1,7	SZIN	100%
	0,125	25	3,2	SZIN	52±0,5%
AMB/ ROSU	2	1,56	1,6	SZIN	100%
	2	25	1,3	ADD	73±1,1%

Az amfotericin B-t kombinálva atorvasztatinnal főként szinergista és additív kölcsönhatásokat tapasztaltunk. A szinergista kölcsönhatások az amfotericin B 100%-os gátláshoz szükséges koncentrációját 4 µg/ml-ről 1 µg/ml-re csökkentették 0,39-12,5 µg/ml-es koncentráció-tartományban alkalmazott atorvasztatinnal kombinálva, míg 25 µg/ml-es sztatin-koncentrációnál a kölcsönhatások additívvá váltak, és lecsökkent a gátlás mértéke. A MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges koncentráció is jelentős mértékben eltolódott, 0,5-1 µg/ml-ről 0,06-0,125 µg/ml-re **(38. Melléklet)**.

Az amfotericin B/roszuvasztatin kombinációban a kölcsönhatások főként semlegesnek bizonyultak. Néhány jelentősebb szinergista kölcsönhatás következtében a 100%-os gátláshoz szükséges amfotericin B-koncentráció 4 µg/ml-ről 2 µg/ml-re csökkent. Ez a jelentős hatásnövekedés azonban csak az 0,78-12,5 µg/ml-es roszuvasztatin-koncentrációknál volt tapasztalható, mert 25 µg/ml-nél a két szer kölcsönhatása additívvá vált **(39. Melléklet)**. A kölcsönhatások nem eredményezték a MIC<sub>50</sub>-értékek eltolódását.

Az amfotericin B-t pravasztatinnal kombinálva azt tapasztaltuk, hogy a kölcsönhatások elsősorban additívak. Néhány szinergista és additív kombinációban jelentősebb hatásnövekedést lehetett tapasztalni, de ezek nem okozták a MIC-értékek eltolódását.

Az amfotericin B és a lovasztatin kombinációjában kizárólag additív kölcsönhatásokat figyelhattunk meg, de ezek a hatások jelentősen nem befolyásolták az antifungális szer hatékonyságát. Elsősorban az amfotericin B hatása érvényesült.

#### **5.3.5.2. A flukonazol kombinálása sztatinokkal (25. Táblázat)**

A flukonazolt lovasztatinnal kombinálva elsősorban szinergista hatásokat figyeltünk meg. Ezek a hatások a MIC-érték eléréséhez szükséges flukonazol-koncentrációt >64 µg/ml-ről 4 µg/ml-re csökkentették 6,25-25 µg/ml-es koncentrációjú lovasztatin alkalmazása mellett. Az 50%-os gátlás eléréséhez szükséges flukonazol-koncentráció is jelentősen csökkent, 32-64 µg/ml-ről 0,125-0,25 µg/ml-re. A lovasztatin önmagában alkalmazva is képes volt kis mértékű gátló hatást kifejteni **(40. Melléklet)**.

A flukonazol/szimvasztatin kombinációt igen jelentős szinergista együttműködések jellemezték, melyek hatására a 100%-os gátlás eléréséhez szükséges flukonazol-koncentráció 2 µg/ml-re volt csökkenthető, 25 µg/ml-es koncentrációjú szimvasztatin jelenlétében. A MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges flukonazol-koncentráció 32-64 µg/ml-ről 0,25-0,5 µg/ml-re

csökkent. A szimvasztatin önmagában is képes volt kisebb mértékben gátolni a vizsgált izolátum növekedést **(41. Melléklet)**.

A fluvasztatin kombinációkban igen jelentős additív és szinergista kölcsönhatásokat figyelhettünk meg. A flukonazol 16 µg/ml-es koncentrációban önmagában alkalmazva 40%-os növekedésgátlást okozott, azonban a szinergista hatásoknak köszönhetően a fluvasztatin-koncentráció növekedésével (1,56-25 µg/ml) az antifungális hatás mértéke elérte a 100%-ot. A szinergista kölcsönhatások a MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges flukonazol-koncentrációt is több lépcsővel csökkentették 32-64 µg/ml-ről 0,125-0,25 µg/ml-re. A fluvasztatin önmagában is képes volt 31%-os gátlás kifejtésére 25 µg/ml-es koncentrációban **(42. Melléklet)**.

**25. Táblázat.** A legjelentősebb flukonazol/sztatin kombinációk.

Kombináció	Antifungális szer (µg/ml)	Sztatin (µg/ml)	Átlag IR	Kölcsönhatás típusa	Gátlás mértéke (%)
FLUK/ LOVA	4	25	1,7	SZIN	100%
	0,25	25	1,6	SZIN	58±3,0%
FLUK/ SZIM	2	25	1,8	SZIN	100%
	0,5	25	1,2	ADD	54±2,4
FLUK/ FLUV	16	25	1,7	SZIN	100%
	0,25	12,5	1,6	SZIN	61±5,5%
FLUK/ ATOR	32	25	1,9	SZIN	100%
	0,25	25	1,8	SZIN	53±1,9%
FLUK/ ROSU	1	25	2,1	SZIN	100%
	0,25	12,5	1,4	ADD	60±5,8%
FLUK/ PRAV	8	25	1,6	SZIN	57±1,7%

A flukonazolt atorvasztatinnal kombinálva főként szinergista hatásokat tapasztaltunk. A 32 µg/ml-es koncentrációban a flukonazol már csak 49%-os gátlást volt képes kifejteni, de 25 µg/ml-es atorvasztatin hatására ez a gátló hatás 100%-ra emelkedett. A MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges flukonazol-koncentráció is jelentősen csökkent 32-64 µg/ml-ről 0,125-0,25 µg/ml-re **(43. Melléklet)**.



A flukonazol/roszuvasztatin kombinációra számos igen jelentős hatással bíró szinergista kölcsönhatás volt jellemző. Az emelkedő roszuvasztatin-koncentrációval minden kombinációban folyamatosan emelkedett a flukonazol gátló hatása. A 100%-os gátláshoz szükséges flukonazol-koncentráció ennek következtében az eredeti >64 µg/ml-ről 1 µg/ml-re csökkent. A MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges flukonazol-koncentráció 0,125-0,25 µg/ml-re csökkent **(44. Melléklet)**.

A flukonazol/pravasztatin kombinációt túlnyomórészt additív kölcsönhatások jellemezték. Ezeknek a kölcsönhatásoknak köszönhetően a MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges flukonazol-koncentráció magasabb pravasztatin-koncentrációkkal (3,125-25 µg/ml) kombinálva 32-64 µg/ml-ről 4-8 µg/ml-re csökkent. A 100%-os gátláshoz szükséges flukonazol-koncentrációt nem változtatták meg a kombinációk **(45. Melléklet)**.

#### **5.3.5.3. Az itraconazol kombinálása sztatinnal (26. Táblázat)**

Kizárólag additív hatások jellemezték az itraconazol/lovasztatin kombinációt. Az itraconazol teljes gátláshoz szükséges koncentrációja 2 µg/ml-ről 0,125 µg/ml-re csökkent. A MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges itraconazol-koncentráció 0,015-0,03 µg/ml-ről 0,015 µg/ml alá csökkent **(46. Melléklet)**.

Az itraconazol/szimvasztatin kombinációt számos additív és néhány szinergista kölcsönhatás jellemezte. A szinergista kölcsönhatások a 100%-os gátlás eléréséhez szükséges itraconazol-koncentrációt 2 µg/ml-ről 0,015 µg/ml-re csökkentették 12,5-25 µg/ml-es szimvasztatin-koncentrációk mellett. A MIC<sub>50</sub>-érték 0,015 µg/ml alá esett 1,56-25 µg/ml-es szimvasztatin-koncentrációk alkalmazása mellett **(47. Melléklet)**.

Az itraconazol/fluvasztatin kombinációt additív kölcsönhatások és néhány szinergista kölcsönhatás jellemezték. Az additív és szinergista hatások jelentősen megnövelték az itraconazol hatékonyságát. A 0,03 µg/ml-es koncentrációban az itraconazol önmagában kifejtett gátló hatása 67%, de az emelkedő fluvasztatin-koncentrációk (0,39-25 µg/ml) hatására folyamatosan növekedve elérte a 100%-os értéket. A MIC<sub>50</sub>-értéket nem tudtuk megállapítani, mivel az a legkisebb alkalmazott itraconazol-koncentráció (0,015 µg/ml) alá esett. A fluvasztatin önmagában is képes volt kisebb mértékben gátolni a *C. tropicalis* növekedését **(48. Melléklet)**.

**26. Táblázat.** A legjelentősebb itraconazol/sztatin kombinációk.

Kombináció	Antifungális szer (µg/ml)	Sztatin (µg/ml)	Átlag IR	Kölcsönhatás típusa	Gátlás mértéke (%)
ITRA/LOVA	0,125	25	1,4	ADD	100%
	0,015	3,125	1,3	ADD	59±1,1%
ITRA/SZIM	0,015	12,5	1,8	SZIN	100%
ITRA/FLUV	0,03	12,5	1,4	ADD	100%
	0,015	0,39	1,5	SZIN	73±5,2%
ITRA/ATOR	0,03	6,25	2,2	SZIN	100%
	0,015	0,39	1,8	SZIN	77±5,8%
ITRA/ROSU	0,25	6,25	1,3	ADD	100%
	0,125	25	1,3	ADD	93±1,7%
ITRA/PRAV	0,015	25	1,1	ADD	53±0,9%

Főként additív és kisebb mértékben szinergista kölcsönhatások jellemezték az itraconazol/atorvasztatin kombinációt. A szinergista hatások következtében már 0,015 µg/ml-es itraconazol-koncentráció is közel 100%-os gátlást eredményezett, 3,125-25 µg/ml-es koncentrációjú atorvasztatinnal kombinálva. A teljes gátláshoz szükséges antifungális szer koncentráció 2 µg/ml-ről 0,03 µg/ml-re csökkent. A MIC<sub>50</sub>-értéket nem tudtuk megállapítani, mivel az a legkisebb alkalmazott itraconazol-koncentráció (0,015 µg/ml) alá esett **(49. Melléklet)**.

Az itraconazolt roszuvasztatinnal kombinálva kizárólag additív hatásokat figyelhattunk meg, melyek következtében a MIC-érték eléréséhez szükséges itraconazol-koncentráció 2 µg/ml-ről 0,25 µg/ml-re csökkent, 6,25-25 µg/ml-es sztatin-koncentrációkat alkalmazva. A MIC<sub>50</sub>-érték változatlan maradt **(50. Melléklet)**.

Az itraconazolt pravasztatinnal kombinálva főként semleges, és additív kölcsönhatásokat figyelhattunk meg. A jelentősebb additív hatások következtében a MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges itraconazol-koncentráció 0,015-0,03 µg/ml-ről megközelítőleg 0,015 µg/ml-re csökkent, 25 µg/ml-es koncentrációjú pravasztatinnal kombinálva **(51. Melléklet)**.

#### 5.3.5.4. A grizeofulvin kombinálása sztatinnal (27. Táblázat)

A grizeofulvin/fluvasztatin kombinációban jelentős szinergista és additív hatásokat figyelhattunk meg. A grizeofulvin önmagában alkalmazva még a legmagasabb koncentrációban (64 µg/ml) sem volt képes jelentős mértékben gátolni a *C. tropicalis* növekedését, de 25 µg/ml-es koncentrációjú fluvasztatinnal kombinálva a gátlás mértéke 71%-ra nőtt. A MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges koncentráció szintén 25 µg/ml fluvasztatinnal kiegészítve 1-2 µg/ml-re csökkent (**52. Melléklet**). A grizeofulvin hatását a más sztatinnal való kombinációk egyike sem változtatta meg jelentősebb mértékben.

**27. Táblázat.** A legjelentősebb grizeofulvin kombináció.

Kombináció	Antifungális szer (µg/ml)	Sztatin (µg/ml)	Átlag IR	Kölcsönhatás típusa	Gátlás mértéke (%)
GRIS/ FLUV	64	25	1,8	SZIN	71±0,9%
	2	25	1,3	ADD	55±1,2%

#### 5.3.5.5. A ketokonazol kombinálása sztatinnal (28. Táblázat)

A ketokonazol/lovasztatin kombinációban kiemelkedő szinergista kölcsönhatásokat figyelhattunk meg. A MIC-érték eléréséhez szükséges ketokonazol-koncentráció az eredeti 8 µg/ml-ről 0,06 µg/ml-re csökkent. Az antifungális szer 50%-os gátláshoz szükséges koncentrációja 0,03 µg/ml alá esett már a legkisebb koncentrációban (0,39 µg/ml) alkalmazott lovasztatin hatására is (**53. Melléklet**).

A ketokonazol/szimvasztatin kombinációt számos igen jelentős szinergista kölcsönhatás jellemezte, melyek következtében a 100%-os gátlás eléréséhez szükséges ketokonazol-koncentráció 8 µg/ml-ről 0,03 µg/ml-re volt csökkenthető. A MIC<sub>50</sub>-érték már 0,78 µg/ml-es szimvasztatin-koncentráció hatására is alacsonyabbnak bizonyult, mint 0,03 µg/ml (**54. Melléklet**).

A ketokonazol/fluvasztatin kombinációban túlnyomó részben szinergista és számos additív kombinációt figyeltünk meg. A ketokonazol 4 µg/ml-es koncentrációban önmagában alkalmazva 59%-os gátlást fejtett ki a vizsgált izolátumra, azonban a növekvő fluvasztatin-koncentráció hatására ez 100%-ra nőtt. Még 0,03 µg/ml-es koncentrációban is teljes gátlás

volt elérhető 3,125-25 µg/ml-es koncentráció-tartományban alkalmazott fluvasztatinnal kombinálva **(55. Melléklet)**.

**28. Táblázat.** A legjelentősebb ketokonazol/sztatin kombinációk.

Kombináció	Antifungális szer (µg/ml)	Sztatin (µg/ml)	Átlag IR	Kölcsönhatás típusa	Gátlás mértéke (%)
KETO/ LOVA	0,06	25	1,8	SZIN	100%
	0,03	0,39	1,2	ADD	54±1%
KETO/ SZIM	0,03	12,5	1,8	SZIN	100%
	0,03	0,78	1,4	ADD	58±2,9%
KETO/ FLUV	0,03	3,125	2,2	SZIN	100%
KETO/ ATOR	0,03	6,25	2,4	SZIN	100%
KETO/ ROSU	0,03	3,125	2,3	SZIN	100%
KETO/ PRAV	2	25	1,6	SZIN	97±0,4%

A ketokonazol atorvasztatinnal kombinálva főként szinergista kölcsönhatásokat figyelhattunk meg. Az antifungális szer 100%-os gátlás eléréséhez szükséges koncentrációja 8 µg/ml-ről 0,03 µg/ml-re csökkent, 6,25-25 µg/ml-es koncentráció-tartományban alkalmazott atorvasztatinnal kiegészítve **(56. Melléklet)**.

A ketokonazol/rosvasztatin kombinációra szintén számos szinergista kölcsönhatás volt jellemző. Ezeknek a hatásoknak köszönhetően a 100%-os gátlás eléréséhez szükséges ketokonazol-koncentráció 8 µg/ml-ről 0,03 µg/ml-re csökkent már 3,125 µg/ml-es rosvasztatin-koncentráció mellett. A kombinációk hatására a vizsgált izolátum 50%-os gátlásához elegendő ketokonazol-koncentráció 0,03 µg/ml alá csökkent már 0,39 µg/ml-es koncentrációjú rosvasztatin hatására is. **(57. Melléklet)**.

A ketokonazol pravasztatinnal kombinálva elsősorban additív kölcsönhatásokat eredményezett. A szinergista kölcsönhatásoknak köszönhetően a 100%-os gátláshoz

szükséges ketokonazol-koncentráció 8 µg/ml-ről közel 2 µg/ml-re csökkent. A MIC<sub>50</sub>-értéket nem befolyásolták a kölcsönhatások **(58. Melléklet)**.

#### 5.3.5.6. A nystatin kombinálása sztatinnal (29. Táblázat)

A nystatin/szimvasztatin kombinációra az additív kölcsönhatások voltak jellemzőek. A 100%-os gátláshoz szükséges nystatin-koncentrációt nem befolyásolták az együtthatások, azonban a MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges antifungális szer koncentrációja a legmagasabb sztatinnal kombinálva 0,03 µg/ml alá csökkent **(59. Melléklet)**.

**29. Táblázat.** A legjelentősebb nystatin/sztatinnal kombinációk.

Kombináció	Antifungális szer (µg/ml)	Sztatinnal (µg/ml)	Átlag IR	Kölcsönhatás típusa	Gátlás mértéke (%)
NYS/ SZIM	0,03	25	1,0	ADD	55±3,2%
NYS/ FLUV	0,5	25	1,8	SZIN	100%
	0,03	25	1,9	SZIN	70±2,2%

A nystatint fluvasztatinnal kombinálva a szinergista kölcsönhatások dominanciáját figyelhettük meg. A 0,5 µg/ml-es koncentrációban a nystatin önmagában alkalmazva 31%-os gátlást volt képes kifejteni, de a növekvő fluvasztatin-koncentrációknak köszönhetően ez a gátló hatás fokozatosan elérte a 100%-ot. A nystatin MIC<sub>50</sub>-értékét 0,5-1 µg/ml-es koncentráció-tartományban határoztuk meg, de a kölcsönhatásoknak köszönhetően ez az érték is jelentősen csökkent, egészen 0,03 µg/ml alá. A fluvasztatin önmagában is képes kis mértékben gátolni a *C. tropicalis* növekedését **(60. Melléklet)**.

A nystatint pravasztatinnal, rosuvasztatinnal, atorvasztatinnal és lovasztatinnal kombinálva az additív kölcsönhatások voltak a jellemzőek, de ezek egyike sem okozta a nystatin antifungális hatásának jelentős változását.

### 5.3.5.7. A terbinafin kombinálása sztatinnal (30. Táblázat)

A terbinafin/szimvasztatin kombinációban az additív hatások domináltak. A szinergista kombinációk nem változtatták meg jelentősen az antifungális szer önmagában kifejtett gátló hatását. A 100%-os gátláshoz szükséges terbinafin-koncentrációt nem befolyásolták a kölcsönhatások, azonban az antifungális szer MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges koncentrációját 2-4 µg/ml-ről 0,5-1 µg/ml-re csökkentették. A szimvasztatin önmagában is képes számottevően gátolni a növekedést **(61. Melléklet)**.

A terbinafin/fluvasztatin kombinációt elsősorban additív kölcsönhatások jellemezték. A 4 µg/ml-es koncentrációban a terbinafin antifungális hatása 87%-os gátlást eredményezett, de a növekvő fluvasztatin-koncentrációkkal ez a hatás folyamatosan emelkedve elérte a 100%-ot. A MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges terbinafin-koncentráció 2-4 µg/ml-ről 0,015 µg/ml alá csökkent. A fluvasztatin önmagában alkalmazva is képes volt kis mértékben gátolni a vizsgált izolátum növekedését **(62. Melléklet)**.

**30. Táblázat.** A legjelentősebb terbinafin/sztatin kombinációk.

Kombináció	Antifungális szer (µg/ml)	Sztatin (µg/ml)	Átlag IR	Kölcsönhatás típusa	Gátlás mértéke (%)
TERB/ SZIM	1	25	1,0	ADD	56±3,3%
TERB/ FLUV	4	25	1,1	ADD	100%
	0,015	6,25	1,3	ADD	60±1,5%
TERB/ ROSU	4	25	1,4	ADD	100%
	1	25	1,6	SZIN	57±2,1%

A terbinafin/roszuvasztatin kombinációt additív és szinergista hatások jellemezték. Az additív kölcsönhatásoknak köszönhetően a 100%-os gátlás eléréséhez szükséges terbinafin-koncentráció 4 µg/ml-re csökkent. A szinergista kombinációk a MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges terbinafin-koncentrációt 2-4 µg/ml-ről 0,5-1 µg/ml-re csökkentették **(63. Melléklet)**.

A terbinafint pravasztatinnal, atorvasztatinnal és lovasztatinnal kombinálva nem tapasztaltunk olyan kölcsönhatást, amely jelentősen befolyásolta volna a szer önmagában kifejtett antifungális hatását.

#### 5.3.5.8. A primycin kombinálása sztatinnal (31. Táblázat)

A primycin/szimvasztatin kombinációt számos szinergista és additív kölcsönhatás jellemezte. A primycin gátló hatása a 8 µg/ml-es koncentrációban 26%-ról, a növekvő koncentrációjú szimvasztatin hatására, elérte a 100%-ot. A MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges primycin-koncentráció az eredeti 8-16 µg/ml-es értékről 1-2 µg/ml-re csökkent 25 µg/ml-es szimvasztatin hatására (64. Melléklet).

A primycin/fluvasztatin kombinációt számos igen jelentős szinergista hatás jellemezte. A 100%-os gátláshoz szükséges primycin-koncentráció a 16 µg/ml-es értékről 2 µg/ml-re csökkent a legmagasabb (25 µg/ml) koncentrációjú fluvasztatinnal kombinálva. A szinergista együttműködéseknek köszönhetően az antifungális szer MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges koncentrációja 0,125 µg/ml alá csökkent szintén a legmagasabb koncentrációban alkalmazott fluvasztatin hatására (65. Melléklet).

**31. Táblázat.** A legjelentősebb primycin/sztatinnal kombinációk.

Kombináció	Antifungális szer (µg/ml)	Sztatinnal (µg/ml)	Átlag IR	Kölcsönhatás típusa	Gátlás mértéke (%)
PRI/ SZIM	8	25	1,4	ADD	100%
	2	25	1,7	SZIN	51±0,5%
PRI/ FLUV	2	25	3,0	SZIN	100%
	0,125	25	2,0	SZIN	66±1,7%
PRI/ ROSU	8	25	5,2	SZIN	86±2,8
PRI/ PRA	8	25	2,7	SZIN	94±1,8%
	8	12,5	1,6	SZIN	53±1,3%

A primycint rosuvasztatinnal kombinálva jelentősebb szinergista kölcsönhatásokat figyelhattunk meg. A 8 µg/ml-es koncentrációban a primycin önmagában 20%-os gátló hatást fejtett ki a vizsgált izolátumra, de ez a hatás a növekvő rosuvasztatin-koncentrációval

folyamatosan emelkedve elérte a 86%-ot. A gátló hatás emelkedésével a MIC<sub>50</sub>-érték is eltolódott az eredeti 8-16 µg/ml-es értékről 4-8 µg/ml-re **(66. Melléklet)**.

A primycint pravasztatinnal kombinálva a kölcsönhatások főként semlegesnek bizonyultak. Egy jelentősebb szinergista hatást tapasztaltunk 8 µg/ml-es primycin és 25 µg/ml-es koncentrációjú pravasztatin kombinációjában, ahol a gátlási százalék az eredeti 34%-ról 94%-ra nőtt. A MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges primycin-koncentráció 4-8 µg/ml-re csökkent, 12,5-25 µg/ml-es koncentrációjú pravasztatinnal kombinálva **(67. Melléklet)**.

A primycint atorvasztatinnal és lovasztatinnal kombinálva nem figyeltünk meg jelentős kölcsönhatásokat. A MIC-értékek nem tolódtak el, a primycin antifungális hatása érvényesült.

A *C. tropicalis* CBS 94 izolátum bizonyult a legérzékenyebbnek a vizsgált kombinációkban. Minden antifungális szer esetében volt olyan interakciós partner, melynek hatására jelentősen megemelkedett az antimikotikum gátló hatása. Az amfotericin B esetében az atorvasztatin bizonyult a leghatékonyabbnak. A flukonazol esetében a roszuvasztatin, az itrakonazol esetében a szimvasztatin hatása volt a legkiemelkedőbb. A vizsgált *C. parapsilosis* CBS 604 és *C. guilliermondii* CBS 566 törzsekkel ellentétben a *C. tropicalis* CBS 94 izolátum esetében a grizeofulvin hatékonyságát is jelentősebben befolyásolta egy sztatin, a fluvasztatin. A ketokonazol antifungális hatását a pravasztatin kivételével minden vizsgált sztatin nagymértékben megnövelte. A nystatin, terbinafin és a primycin esetében a leghatékonyabb interakciós partnernek a fluvasztatin bizonyult. Antagonizmust egyetlen kombinációban sem tapasztaltunk.



## 6. Összefoglalás

Az elmúlt évtizedekben jelentősen megemelkedett a nem-*albicans* *Candida* fajok által okozott megbetegedések száma. A különböző *Candida* fajok eltérő mértékű érzékenységgel rendelkezhetnek a különböző antifungális szerekkel szemben, ezért egyre fontosabb a pontos, gyors, fajsztípusú azonosítás a megfelelő terápiás szer kiválasztásához. Kutatócsoportunk kifejlesztett egy gyors, PCR alapú kimutatási rendszert, mellyel a leggyakrabban előforduló humán patogén *Candida* fajok közül kilencet lehet teljes biztonsággal azonosítani.

A kimutatási reakciók első csoportját az rDNS-génkomplexre terveztük, és nyolc *Candida* faj (*C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis sensu lato*) azonosítására volt alkalmas. Célunk egy olyan multiplex PCR technika kidolgozása volt, mely minden faj esetében egyedi méretű amplikont eredményez. A nyolc fajt két csoportra osztva terveztünk egy-egy csoportra specifikus és nyolc fajspecifikus indítószekvenciát. Az első, 5,8S rRNS-régióra tervezett közös indítószekvenciával rendelkező csoportba a *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* és a *C. glabrata* tartozott, a második csoportot a *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* és *C. parapsilosis sensu lato* fajok alkották, melyek közös indítószekvenciáját a 18S rRNS-régióra terveztük. A kimutatási reakciókat 14 *Candida* faj (*C. albicans* ATCC 10231, *C. lusitaniae* CBS 6936, *C. krusei* CBS 573, *C. inconspicua* CBS 180, *C. dubliniensis* CBS 7987, *C. tropicalis* CBS 94, *C. norvegensis* SZMC 198, *C. pulcherrima* CBS 5833, *C. glabrata* CBS 138, *C. parapsilosis* CBS 604, *C. guilliermondii* CBS 566, *C. zeylanoides* CBS 619, *C. lipolytica* CBS 6124, *C. norvegica* CBS 4239) felhasználásával teszteltük. A reakció optimalizálása után az általunk felhasznált referenciatörzsek egyike sem eredményezett aspecifikus terméket, és a ciklusok idejének rövidítésével lehetőségünk nyílt egy megközelítőleg egy órát igénylő program kidolgozására.

Célkitűzéseink közt szerepelt egy ellenőrző reakció megtervezése is. A kimutatás alapjául egykópiás magi géneket választottunk (*FTR*, *PLD*). Az *FTR* gén általunk vizsgált szakasza nem bizonyult megfelelőnek egy megbízható fajspecifikus reakció kifejlesztésére, a *PLD* génszakasz azonban lehetővé tette a pontos kimutatásra alkalmas indítószekvenciák tervezését. A reakciókat szintén multiplex körülményekre optimalizáltuk, de ebben az esetben nem nyílt lehetőség olyan közös indítószekvenciák megtervezésére, melyek kettőnél több faj esetében is alkalmazhatóak lettek volna. A vizsgált génszakasz nem tette lehetővé az rDNS-

génkomplexre tervezett kimutatási reakciók által azonosítható összes *Candida* faj detektálását. Az azonosítható fajok közül hét megegyezett az rDNS-szakaszra tervezett indítószekvenciákkal kimutatható fajokkal (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*), de nem tette lehetővé a *C. lusitaniae* izolátumok detektálását. Lehetőségünk nyílt egy, az utóbbi években egyre több fertőzést okozó faj, a *Candida kefyr* kimutatására alkalmas reakció megtervezésére is. A kidolgozott indítószekvenciák minden esetben alkalmasnak bizonyultak a fajok pontos kimutatására, és multiplex körülmények között is alkalmazhatóak voltak.

Megvizsgáltuk a reakciók érzékenységét kolónia PCR segítségével. Megközelítőleg  $1 \times 10^8$  sejt/ml-es szuszpenzió felhasználásával tízszeres léptékű hígítási sort készítettünk desztillált vízben, melynek utolsó tagja megközelítőleg  $1 \times 10^3$  telepképző egység/ml volt. A reakciókban 1  $\mu$ l-t használtunk templátként. Az egyértelmű kimutatáshoz szükséges sejtkoncentráció a  $10^4$  és  $10^5$  sejt/ml-es koncentrációk közé esett. A *PLD* génszakaszra tervezett reakció érzékenysége a  $10^5$ - $10^6$  sejt/ml-es tartományban bizonyult megfelelőnek.

Munkánk során megvizsgáltuk a hazai *C. parapsilosis* izolátumok genetikai és esetleges fenotípusos variabilitását.

A *C. parapsilosis* fajon belüli genetikai variabilitását RAPD analízissel és az rDNS-génklusztter ITS régiójának szekvenciaanalízise révén vizsgáltuk. A Luo és Mitchell (2002) által tervezett, *C. parapsilosis sensu lato* csoportra specifikus indítószekvenciákkal a 26 izolátum közül 20 esetében tudtuk megerősíteni a korábbi azonosítás eredményét. A helytelenül azonosított izolátumok ITS szekvenciaanalízise alapján 2 izolátum *C. lusitaniae*-nek, 3 izolátum *C. krusei*-nek és 1 izolátum *C. albicans*-nak bizonyult.

A RAPD analízis során a 20 vizsgált izolátum között azonosítottunk egy csoportot, melyen belül nem volt tapasztalható magas heterogenitás; több indítószekvencia esetében azonos vagy nagyon hasonló RAPD-mintázatot figyelhattunk meg. Két izolátum ettől a csoporttól elkülönült, de számos esetben igen hasonló mintázattal rendelkeztek. A későbbi ITS analízis alapján ez a két izolátum *C. metapsilosis*-nak bizonyult.

A molekuláris eredményeket alátámasztotta az API 20C AUX szénforrás asszimilációs teszt is; csak a két *C. metapsilosis* izolátum volt képes a D-xilitolt szénforrásként felhasználni.

A minták antimikotikumokkal szembeni érzékenységét Etest segítségével határoztuk meg. A *C. metapsilosis* izolátumok érzékenyebbek bizonyultak a *C. parapsilosis* izolátumoknál amfotericin B-vel és vorikonazollal szemben.

A vizsgált 209 *Candida* izolátumból 20 tartozott a tágabb értelemben vett *C. parapsilosis* fajhoz, tehát 2004-2005 során a két kórházban a kórokozó *Candida* törzsek 9,6 %-át ez a faj tette ki.

Specifikus PCR alapú azonosítást dolgoztunk ki az rDNS-génklusztér felhasználásával *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* izolátumok elkülönítésére. A génbanki és saját szekvenciák illesztéseinek elemzésekor a *C. metapsilosis* szekvenciák között jelentősebb eltéréseket tapasztaltunk, melyek két csoportra osztották a vizsgált izolátumokat. Az elkülönülő II-es csoportra specifikus indítószekvenciát terveztünk. Az indítószekvenciák a tesztelések során alkalmasnak bizonyultak a fajsztíntű azonosításra. A tanszékünkön található *C. parapsilosis sensu lato* izolátumok között sikeresen azonosítottunk két *C. metapsilosis* törzset, melyek a II-es csoportba tartoztak. Megvizsgáltuk két további gén, a transzlációs elongációs faktor alfa (*TEF1- $\alpha$* ) és a 18S rRNS-gének egy-egy szakaszát. Sem a 18S rRNS-szakaszok, sem a *TEF1- $\alpha$*  génszakaszok nem bizonyultak alkalmasnak a két *C. metapsilosis* csoport egyértelmű elkülönítésére. A közeljövőben további gének (aktin, citokróim oxidáz, RNS-polimeráz II) vizsgálatát tervezzük.

Célkitűzéseink közt szerepelt egy olyan antifungális szer/sztatín kombináció kimutatása, mely alkalmas lehet felületi *Candida* fertőzések hatékony kezelésére. Megállapítottuk az antifungális szerek (amfotericin B, ketokonazol, flukonazol, nystatin, grizeofulvin, itrakonazol, primycin, terbinafin) és a sztatínok (lovasztatin, szimvasztatin, fluvasztatin, roszuvasztatin, atorvasztatin, pravasztatin) MIC-értékeit *C. parapsilosis* CBS 604, *C. guilliermondii* CBS 566 és *C. tropicalis* CBS 94 izolátumok esetében. A vizsgált *C. parapsilosis* és *C. guilliermondii* izolátumok vizsgálata során a leghatékonyabb antifungális szernek a ketokonazol és az itrakonazol bizonyult, míg a sztatínok közül a szimvasztatinnal és a fluvasztatinnal sikerült jelentősebb gátlást elérni. A *C. tropicalis* izolátum a nystatin-ra, az itrakonazolra és a primycinre nézve bizonyult a legérzékenyebbnek. A sztatínok közül szintén a szimvasztatin és a fluvasztatin volt a leghatásosabb.

A MIC-értékek megállapítása után elvégeztük az *in vitro* kombinációs vizsgálatokat checkerboard-titrálás segítségével.

A vizsgált *C. parapsilosis* CBS 604 izolátum esetében a grizeofulvin kombinációk egyikében sem tapasztaltunk jelentősebb kölcsönhatásokat. Az itrakonazzal és a ketokonazzal elvégzett vizsgálatok során a két antifungális szer önmagában kifejtett gátló hatása érvényesült, a kombinációk egyikében sem tapasztaltunk antagonista kölcsönhatásokat. A nystatin/sztatín kombinációkban főként semleges kölcsönhatásokat tapasztaltunk, az antifungális szer hatása dominált. A legtöbb együtthatást a terbinafinnal történő

kombinációkban figyelhattunk meg, melyek általában az antifungális szer MIC<sub>50</sub>-érték eléréséhez szükséges koncentrációját egy hígítási lépcsővel csökkentették. Az amfotericin B esetében a legjelentősebb hatásokat az atorvasztatinnal és fluvasztatinnal alkotott kombinációk okozták, míg a flukonazol esetében a fluvasztatin bizonyult a leghatékonyabb interakciós partnernek. A primycin/szatin vizsgálatokban a fluvasztatin és a szimvasztatin bizonyult hatékonynak, míg az atorvasztatinnal elvégzett kombinációkban jelentős antagonizmust figyelhattunk meg.

A *C. guilliermondii* CBS 566 törzs vizsgálata során a legjelentősebb együtt hatásokat az itraconazol/sztatin kombinációkban figyelhattuk meg. A szimvasztatin és az atorvasztatin több lépcsővel csökkentette a teljes gátláshoz szükséges itraconazol-koncentrációt. Az amfotericin B esetében az atorvasztatin, a flukonazol esetében pedig a fluvasztatin bizonyult a leghatékonyabb interakciós partnernek. A nystatin gátló hatása a vizsgált izolátum esetében a *C. parapsilosis*-hoz hasonlóan nem változott jelentősen a kombinációk hatására. A terbinafin hatékonyságát a lovasztatin, szimvasztatin, fluvasztatin és a roszuvasztatin emelte meg jelentősebben, melyek az antifungális szer 50%-os gátláshoz szükséges koncentrációját csökkentették egy hígítási lépcsővel. A primycin esetében jelentős antagonizmust figyeltünk meg a szimvasztatinnal, fluvasztatinnal és atorvasztatinnal elvégzett kombinációk során.

A *C. tropicalis* CBS 94 izolátum felhasználásával elvégzett kombinációs vizsgálatok során számos igen jelentős kölcsönhatást figyeltünk meg. A flukonazol, a ketokonazol és az itraconazol hatása minden sztattinnal kombinálva megnőtt. Az antifungális szer teljes gátláshoz szükséges koncentrációi több lépcsővel csökkenthetőnek bizonyultak. Egyedül a pravasztatin nem befolyásolta a 100%-os gátláshoz szükséges flukonazol és itraconazol-koncentrációt, azonban a MIC<sub>50</sub>-értékek az alacsonyabb koncentrációk felé tolódtak el. Az amfotericin B esetében az atorvasztatin és a roszuvasztatin bizonyult a leghatékonyabb interakciós partnernek. A grizeofulvin hatása a fluvasztatin kombinációkban jelentősen megemelkedett, de a teljes gátlást nem sikerült elérni. A nystatin és a terbinafin gátló hatását a fluvasztatin jelentősen megnövelte. A primycin esetében egyetlen kombinációban sem tapasztaltunk antagonista kölcsönhatásokat. A kölcsönhatások a szimvasztatin esetében egy, a fluvasztatinnal történő kombinációkban három hígítási lépcsővel csökkentették a teljes gátláshoz szükséges primycin-koncentrációt.

A kölcsönhatások vizsgálatai alapján a legtöbb jelentős interakciót a fluvasztatin használatával érték el. A flukonazol hatását *C. parapsilosis* CBS 604 és *C. guilliermondii* CBS 566 esetében a fluvasztatin, az amfotericin B hatását minden vizsgált izolátum esetében az

atorvasztatin növelte meg a leginkább. A legkevésbé hatékony interakciós partnereknek a pravasztatin és a lovasztatin bizonyultak.

## 7. Summary

The number of infections caused by non-albicans *Candida* species has increased substantially during the past decades. The most predominant species causing infections in humans is still *C. albicans*, but a growing number of cases due to *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* and *C. lusitaniae* can be observed. The change in the species distribution can be attributed to the extensive use of fluconazole, the increasing number of surgical interventions and the new reliable diagnostic methods. The different *Candida* species can have different susceptibility profiles to antifungal drugs, therefore the identification of the causative agent of the infection at the species level is crucial in order to find the proper means of therapy.

The aims of this study were:

- The development of a PCR based method for the efficient identification of eight clinically important *Candida* species: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* and *C. lusitaniae*
- The investigation of the occurrence and genetic variability of clinical isolates of *C. parapsilosis* in two Hungarian hospitals.
- The examination of the effect of interactions between antifungal agents and statins on *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *C. guilliermondii*

We developed a rapid PCR-based method that allowed us to identify the most frequent human pathogenic *Candida* species. The first group of the reactions is based on the amplification of part of the rDNA complex. With these reactions we were able to detect and identify eight *Candida* species: *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis sensu lato*. Our aim was to design a multiplex PCR that yields identical amplicons from every *Candida* species. We divided the eight species into two groups and designed two common and eight species specific primers. The first common primer was designed to bind to the 5.8S region of the rDNA complex and targeted *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* and *C. glabrata*. The second common

primer was developed on the basis of sequences of the 18S rRNA gene and targeted *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* and the *C. parapsilosis sensu lato* group. We tested the applicability of the reaction with the involvement of 14 reference strains of clinically relevant *Candida* species: *C. albicans* ATCC 10231, *C. lusitaniae* CBS 6936, *C. krusei* CBS 573, *C. inconspicua* CBS 180, *C. dubliniensis* CBS 7987, *C. tropicalis* CBS 94, *C. norvegensis* SZMC 198, *C. pulcherrima* CBS 5833, *C. glabrata* CBS 138, *C. parapsilosis* CBS 604, *C. guilliermondii* CBS 566, *C. zeylanoides* CBS 619, *C. lipolytica* CBS 6124 and *C. norvegica* CBS 4239. Following the optimization of the reaction, no false positive bands were obtained with any of the reference strains. By the optimization of the cycles of the reaction we were able to design a nearly one-hour-long PCR.

Our second aim was to develop a control reaction. Two single copy genes, *FTR* (high affinity iron permease) and *PLD* (phospholipase D) were chosen as targets. The examined part of the *FTR* gene failed to be suitable for the development of a reliable detection system, while the analyzed region of the *PLD* gene allowed us to design species specific primers. We were not able to design a control reaction suitable for the detection of all species, detected by the previous PCR targeting the rDNA complex. Seven of the eight species were identical except *C. lusitaniae*, and we developed specific primer for *C. kefyr*, which is also an emerging human pathogen. We designed four common primers for *C. albicans/C. dubliniensis*, *C. glabrata/C. kefyr*, *C. tropicalis/C. guilliermondii* and *C. parapsilosis/C. krusei*, as well as eight species specific primers. The developed primer sets were used dependably for the detection of the eight species in single or multiplex PCR.

We investigated the sensitivity of the reactions using colony PCR. A six-step tenfold serial dilution was prepared in distilled water from a suspension with a concentration of  $10^8$  cells/ml. One  $\mu$ l from each step of the dilution was added to each reaction. The sensitivity of the reactions fell into the range of  $10^4$  and  $10^5$  CFU/ml, while in the case of the reaction based on the *PLD* gene it was one step lower ( $10^5$ - $10^6$  CFU/ml).

In the next part of our study we examined the prevalence and genetic variability of Hungarian clinical isolates of *C. parapsilosis*. The genetic variability of *C. parapsilosis sensu lato* isolates was examined using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and the sequence analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region of the rDNA gene cluster. Altogether, 209 *Candida* isolates derived from blood samples from two Hungarian hospitals, located in Debrecen and Pécs were examined. Among the previously identified 26 *C. parapsilosis* isolates 20 were found to belong to the *C. parapsilosis sensu lato* group using the species-specific primer pair developed by Luo and Mitchell (2002). The sequence analysis of

the ITS region revealed the identity of the rest of the isolates as *C. lusitaniae*, *C. krusei*, and *C. albicans* (2, 3 and 1 strains, respectively). RAPD analysis of the isolates was carried out by using 21 random decamer primers. The genetic variability observed among the isolates was low: the majority of the isolates exhibited highly similar or identical RAPD patterns with most primers tested. Two of the isolates showed higher variability compared to the main group, and could also be distinguished from other *C. parapsilosis* isolates using the *C. parapsilosis* group I-specific primer pair, developed by Pontieri *et al.* (2001). According to the ITS sequence analysis the two isolates were identified as *C. metapsilosis*. The two species were also distinguishable by the API 20C AUX kit. The *C. metapsilosis* isolates were found to be able to utilize D-xylitol. We examined the antifungal susceptibility profiles of isolates belonging to the *C. parapsilosis sensu lato* group using the Etest method. The *C. metapsilosis* isolates were found to be more susceptible to amphotericin B and voriconazole than the *C. parapsilosis* strains. Among the examined isolates 9.6% of *Candida* infections were found to be caused by *C. parapsilosis sensu lato* in our survey at two Hungarian hospitals. Two of these isolates were found to belong to the recently described species *C. metapsilosis*.

We developed a PCR-based identification method allowing the differentiation between the members of the *C. parapsilosis sensu lato* group. The target sequence was the ITS region of the rDNA gene complex. During the examination of the sequences of the strains from our culture collection in comparison with corresponding sequences from the NCBI GenBank database, we found high variability between *C. metapsilosis* isolates. Based on the differences in the variable ITS1 region the *C. metapsilosis* isolates could be divided into two groups. We developed a PCR-based technique specific for the distinct groups. Among the strains in our collection we found two isolates belonging to the second group of the *C. metapsilosis* isolates. We examined two further genes, the translation elongation factor 1 alpha (*TEF1- $\alpha$* ) and the 18S rRNA genes. Although the *TEF1- $\alpha$*  sequences were variable in certain positions none of them were able to distinguish reliably between the two groups. We are planning to examine further genes (actin, cytochrome oxidase, RNA polymerase II) to elucidate the differences between the two groups.

We examined the effects of interactions of antifungal agents and statins on *C. parapsilosis* CBS 604, *C. guilliermondii* CBS 566 and *C. tropicalis* CBS 94 strains. Our aim was to discover effective combinations that can be used to treat skin infections caused by *Candida* species. We determined the MIC (Minimal Inhibitory Concentration) values of eight antifungal drugs (amphotericin B, ketoconazole, fluconazole, nystatin, griseofulvin, itraconazole, primycin, terbinafine) and six statins (lovastatin, simvastatin, fluvastatin,



rosuvastatin, atorvastatin, pravastatin) for the three species. In the case of *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii* the most effective antifungal agents were ketoconazole and itraconazole, among the statins simvastatin and fluvastatin caused the highest inhibition in the growth. In the case of *C. tropicalis*, nystatin, itraconazole and primycin appeared to be the most effective antifungal drugs. Among the statins, simvastatin and fluvastatin were the most efficient.

Following the determination of the MIC values we examined the effects of the interactions between the statins and the antifungal agents using the checkerboard-titration method.

In the case of the examined *C. parapsilosis* CBS 604 isolate the griseofulvin/statin combinations did not result in interactions. In the combination of itraconazole and ketoconazole with statins the antifungal agents dominated, antagonistic interactions were not observed. The nystatin/statin combinations resulted in a neutral interaction, with the dominance of the antifungal agent. The highest number of interactions were detected in the terbinafine combinations. The MIC<sub>50</sub> values were lowered by the statins by one dilution step. In the case of amphotericin B the strongest interactions were achieved in the combinations with atorvastatin and fluvastatin, while in the case of fluconazole the combination with fluvastatin was the most effective. In the combinations of primycin with statins, fluvastatin and simvastatin were the best interaction partners, but in the case of atorvastatin strong antagonism was observed.

In the case of *C. guilliermondii* CBS 566, the most effective interactions were observed in the itraconazole/statin combinations. Simvastatin and atorvastatin lowered the concentration needed for the total inhibition of growth by several dilution steps. For amphotericin B the best interactions were caused by atorvastatin. In the case of fluconazole, fluvastatin increased the effect of the antifungal agent the most efficiently. The inhibition of growth caused by nystatin was not affected by statins significantly. The effectiveness of terbinafine was affected mostly by lovastatin, simvastatin, fluvastatin and rosuvastatin. These statins lowered the terbinafine concentration needed for the 50% inhibition by one dilution step. High antagonism was observed in the case of primycin combined with simvastatin, fluvastatin and atorvastatin.

The most significant interactions were observed in the combinations tested with the *C. tropicalis* CBS 94 isolate. The antifungal effect of fluconazole, ketoconazole and itraconazole were increased notably by almost every statins. The MIC values were lowered by several dilution steps. Pravastatin did not affect the MIC values but the MIC<sub>50</sub> values were lowered by one or two dilution steps. In the case of amphotericin B the most effective interaction

partners were atorvastatin and rosuvastatin. The antifungal effect of griseofulvin was increased by fluvastatin but the total inhibition was not achieved. The effect of nystatin and terbinafine was also raised by fluvastatin notably. Antagonism was not observed in the primycin/statin combinations. The interactions with simvastatin lowered the MIC values by one dilution step. Fluvastatin lowered the concentration of primycin needed for the complete inhibition by three dilution steps.

In conclusion, the most effective interaction partner was the fluvastatin. The antifungal effect of fluconazole was raised substantially by fluvastatin in the experiments carried out with *C. parapsilosis* CBS 604 and *C. guilliermondii* CBS 566. The effect of amphotericin B was increased significantly by atorvastatin on all the examined isolates. The least effective interaction partners were pravastatin and lovastatin.

## 8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Kevei Ferenc volt Tanszékvezető Úrnak, hogy szakdolgozóként lehetővé tette, hogy munkámat a Szegedi Tudományegyetem TTK Mikrobiológiai Tanszékén végezzem.

Köszönettel tartozom Dr. Vágvölgyi Csaba tanszékvezetőnek, hogy lelkiismeretesen irányította pályámat.

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek Dr. Varga Jánosnak értékes tanácsaiért, türelméért, és a publikálás területén nyújtott segítségéért.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Kredics Lászlónak a labormunka és a publikáció területén nyújtott hasznos tanácsaiért és segítségéért.

Köszönettel tartozom Dr. Gácsér Attilának, hogy hozzáférhetővé tette számomra az általuk vizsgált izolátumok szekvenciáit és DNS-kivonataikat.

Köszönet illeti munkatársaimat és barátaimat: Dr. Galgóczy Lászlót, Dr. Takó Miklóst, Dr. Hatvani Lórántot, Karácsony Zoltánt és Dr. Nagy Lászlót odaadó segítségükért és barátságukért.

Köszönettel tartozom a Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Mikrobiológiai Tanszék összes dolgozójának, akik munkájukkal, tanácsaikkal segítettek dolgozatom elkészítésében.

Végül, külön köszönettel tartozom Bakai Beátának, aki mindvégig támogatott és nyugodt, szeretetteljes háttérrel biztosított munkám elvégzéséhez.

## 9. Idézett irodalom

Abbas, J., Bodey, G.P., Hanna H.A., Mardani, M., Girgawy, E., Abi-Said D., Whimbey, E., Hachem, R., Raad I. (2000) *Candida krusei* fungemia. An escalating serious infection in immunocompromised patients. Arch. Intern. Med. 160, 2659-2664.

Al-Abeid, H.M., Abu-Elteen, K.H., Elkarmi, A.Z., Hamad, M.A. (2004) Isolation and characterization of *Candida* spp. in Jordanian cancer patients: prevalence, pathogenic determinants, and antifungal sensitivity. Jpn. J. Infect. Dis. 57, 279-284.

Ashford, B. (1928) Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. Am. J. Trop. Med. Hyg. 8, 507–538.

Baddley, J.W., Benjamin, D.K.Jr., Patel, M., Miró, J., Athan, E., Barsic, B., Bouza, E., Clara, L., Elliott, T., Kanafani, Z., Klein, J., Lerakis, S., Levine, D., Spelman, D., Rubinstein, E., Tornos, P., Morris, A.J., Pappas, P., Fowler, V.G.Jr., Chu, V.H., Cabell, C.; International Collaboration on Endocarditis-Pro prospective Cohort Study Group (ICE-PCS). (2008) *Candida* infective endocarditis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 27, 519–529.

Baires-Varguez, L., Cruz-García, A., Villa-Tanaka, L., Sánchez-García, S., Gaitán-Cepeda, L.A., Sánchez-Vargas, L.O., Quindós, G., Hernández-Rodríguez, C. (2007) Comparison of a randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and ATB ID 32C system for identification of clinical isolates of different *Candida* species. Rev. Iberoam. Micol. 24, 148-151.

Barchiesi, F., Tortorano, A.M., Di Francesco, L.F., Cogliati, M., Scalise, G., Viviani, M.A. (1999) *In-vitro* activity of five antifungal agents against uncommon clinical isolates of *Candida* spp. J. Antimicrob. Chemother. 43, 295-299.

Barrios-González, J., Miranda, R.U. (2010) Biotechnological production and applications of statins. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85, 869-883.

Bassetti, M., Righi, E., Costa, A., Fasce, R., Molinari, M. P., Rosso, R., Pallavicini, F. B., Viscoli, C. (2006) Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. BMC Infect. Dis. 6, 21.

- Cantón, E., Pemán, J., Gobernado, M., Viudes, A., Espinel-Ingroff, A. (2005) Synergistic activities of fluconazole and voriconazole with terbinafine against four *Candida* species determined by checkerboard, time-kill, and Etest methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1593-1596.
- Carlson, J.A., Mann, H.J., Canafax, D.D. (1983) Effect of pH on disintegration and dissolution of ketoconazole tablets. *Am. J. Hosp. Pharm.* 40, 1334-1336.
- Carrillo-Muñoz, A.J., Giusiano, G., Ezkurra, P.A., Quindós, G. (2006) Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev. Esp. Quimioter.* 19, 130-139.
- Carvalho, A., Costa-De-Oliveira, S., Martins, M.L., Pina-Vaz, C., Rodrigues, A.G., Ludovico, P., Rodrigues, F. (2007) Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Med. Mycol.* 45, 619-627.
- Casalnuovo, I.A., Di Francesco, P., Garaci, E. (2004) Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 8, 69-77.
- Chai, L.Y., Denning, D.W., Warn, P. (2010) *Candida tropicalis* in human disease. *Crit. Rev. Microbiol.* 36, 282-298.
- Chen, S.C.A., Sorell, T.C. (2007) Antifungal Agents. *Med. J. Aust.* 187:404-409.
- Chin, N.X., Weitzman, I., Della-Latta, P. (1997) *In vitro* activity of fluvastatin, a cholesterol-lowering agent, and synergy with flucanazole and itraconazole against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 850-852.
- Chin, T.W., Loeb, M., Fong, I.W. (1995) Effects of an acidic beverage (Coca-Cola) on absorption of ketoconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1671-1675.
- Como, J.A., and Dismukes, W.E. (1994) Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *N. Engl. J. Med.* 330, 263-272.
- Cuenca-Estrella, M., Mellado, E., Díaz-Guerra, T.M., Monzón, A., Rodríguez-Tudela, J.L. (2000) Susceptibility of fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida* spp. to echinocandin LY303366, itraconazole and amphotericin B. *J Antimicrob. Chemother.* 46, 475-477.
- de Hoog, G.S., Guarro, J., Gene, J., Figueras, M.J. (2000) *Atlas of clinical fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands, pp. 2112-214.
- de Toro, M., Torres, M.J., Maite, R., Aznar, J. (2011) Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 418-424.
- Deshpande, K. (2003) *Candida parapsilosis* fungaemia treated unsuccessfully with amphotericin B and fluconazole but eliminated with caspofungin: a case report. *Crit. Care Resusc.* 5, 20-23.

Dóczi, I., Dósa, E., Hajdu, E., Nagy, E. (2002) Aetiology and antifungal susceptibility of yeast bloodstream infections in a Hungarian university hospital between 1996 and 2000. J. Med. Microbiol. 51, 677-681.

Dolan, J.W., Bell, A.C., Hube, B., Schaller, M., Warner, T.F., Balish, E. (2004) *Candida albicans* PLD I activity is required for full virulence. Med. Mycol. 42, 439-447.

Favel, A., Michel-Nguyen, A., Datry, A., Challier, S., Leclerc, F., Chastin, C., Fallague, K., Regli, P. (2004) Susceptibility of clinical isolates of *Candida lusitanae* to five systemic antifungal agents. J. Antimicrob. Chemother. 53, 526-529.

Felsenstein, J. (1995). PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Version 3.57c. Distributed by the author. Seattle: Department of Genetics, University of Washington.

Flückiger, U., Marchetti, O., Bille, J., Eggimann, P., Zimmerli, S., Imhof, A., Garbino, J., Ruef, C., Pittet, D., Täuber, M., Glauser, M., Calandra, T., the Fungal Infection Network of Switzerland (FUNGINOS). (2006) Treatment options of invasive fungal infections in adults. Swiss Med. Wkly. 22, 447-463.

Fundyga, R.E., Kuykendall, R.J., Lee-Yang, W., Lott, T.J. (2004) Evidence for aneuploidy and recombination in the human commensal yeast *Candida parapsilosis*. Infect. Genet. Evol. 4, 37-43.

Galgóczy, L., Nyilasi, I., Papp, T., Vágvolgyi, C. (2009) Are statins applicable for the prevention and treatment of zygomycosis? Clin. Infect. Dis. 49, 483-484.

Galgóczy, L., Nyilasi, I., Papp, T., Vágvolgyi, Cs.(2011) Statins as antifungal agents. World J. Clin. Infect. Dis. 1, 4-10.

Ghannoum, M.A. (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin. Microbiol. Rev. 13, 122-143.

Girmenia, C., Pizzarelli, G., Cristini, F., Barchiesi, F., Spreghini, E., Scalise, G., and Martino, P. (2006) *Candida guilliermondii* fungemia in patients with hematologic malignancies. J. Clin. Microbiol. 44, 2458-2464.

Gisi, U. (1996) Synergistic interaction of fungicides in mixtures. Phytopathology 86, 1273-1279.

Gomez-Lopez, A., Alastruey-Izquierdo, A., Rodriguez, D., Almirante, B., Pahissa, A., Rodriguez-Tudela, J.L., Cuenca-Estrella, M., the Barcelona Candidemia Project Study Group (2008) Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: Results from population-based surveillance of candidemia in Spain. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 1506-1509.

Gudlaugsson, O., Gillespie, S., Lee, K., Vande Berg, J., Hu, J., Messer, S., Herwaldt, L., Pfaller, M., Diekema, D. (2003) Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. Clin. Infect. Dis. 37, 1172-1177.

Gutiérrez, J., Morales, P., González, M.A., Quindós, G. (2002) *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. J. Basic Microbiol. 42, 207-227.

Gyetvai, Á., Emri, T., Takács, K., Dergez, T., Fekete, A., Pesti, M., Pócsi, I., Lenkey, B. (2006) Lovastatin possesses a fungistatic effect against *Candida albicans* but does not trigger apoptosis in this opportunistic human pathogen. FEMS Yeast Res. 6, 1140-1148.

Hawkins, J.L., Baddoura, L.M. (2003) *Candida lusitanae* infections in the era of fluconazole availability. Clin. Infect. Dis. 36, 14-18.

Henao, N.A., Vagner, B. (2011) Infections of the central nervous system by *Candida*. J. Infect. Dis.: Immun. 3, 79-84.

Horváth, I., Kramer, M., Bauer P.I., Büki K.G. (1979) The mode of action of primycin. Arch. Microbiol. 121, 135-139.

Huijgens, P.C., Simoons-Smit, A.M., van Loenen, A.C., Prooy, E., van Tinteren, H., Ossenkoppele, G.J., Jonkhoff, A.R. (1999) Fluconazole versus itraconazole for the prevention of fungal infections in haemato-oncology. J. Clin. Pathol. 52, 376–380.

Ibrahim, A.S., Gebremariam, T., Lin, L., Luo, G., Hussein, M.I., Skory, C.D., Fu, Y., French, S.W., Edwards, J.E. Jr., Spellberg, B. (2010) The high affinity iron permease is a key virulence factor required for *Rhizopus oryzae* pathogenesis. Mol. Microbiol. 77, 587-604.

Iida, S., Imai, T., Oguri, T., Okuzumi, K., Yamanka, A., Moretti-Branchini, M., Nishimura, K., Mikami, Y. (2005) Genetic diversity of the internal transcribed spacers (ITS) and 5.8 S rRNA genes among clinical isolates of *Candida parapsilosis* in Brazil and Japan. Jpn. J. Med. Mycol. 46, 133-137.

Joshi, K.R., Bremner, D.A., Parr, D.N., Gavin, J.B. (1975) The morphological identification of pathogenic yeasts using carbohydrate media. J. Clin. Pathol. 28, 18-24.

Kanbe, T., Horii, T., Arishima, T., Ozeki, M., Kikuchi, A. (2002) PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. Yeast 19, 973-989.

Kawanabe, K., Hayashi, H., Miyamoto, M., Tamura, J., Shimizu, M., Nakamura, T. (2003) *Candida* septic arthritis of the hip in a young patient without predisposing factors. J. Bone Joint Surg. Br. 85, 734-735.

Kim, S.Y., Lim, J.S., Kim, D.H., Lee, H.J., Cho, J.B., Lee, J.A., Kim, D.H., Kim, S.Y., Lim, J.S., Kim, D.H., Lee, H.J., Cho, J.B., Lee, J.A., Kim, D.H. (2011) *Candida tropicalis* arthritis of the elbow in a patient with Ewing's sarcoma that successfully responded to itraconazole. Korean J. Pediatr. 54, 385-388.

Klotz, S.A., Penn C.C., Negvesky G.J., Butrus S.I. (2000) Fungal and parasitic infections of the eye. Clin Microbiol Rev. 13, 662-685.

Kocsubé, S., Tóth, M., Vágvölgyi, Cs., Dóczi, I., Pesti, M., Pócsi, I., Szabó, J., Varga, J. (2007) Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis sensu lato* in Hungary. J. Med. Microbiol. 56, 190-195.

Kojic, E.M., Darouiche, R.O. (2004) *Candida* infections of medical devices. Clin. Microbiol. Rev. 17, 255-267.

Kontoyiannis, D.P., Vaziri, I., Hanna, H.A., Boktour, M., Thornby J., Hachem R., Gerald P. Bodey G.P., Raad I. (2001) Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. Clin. Infect. Dis. 33, 1676-1681.

Kothavade, R.J., Kura, M.M., Valand, A.G., Panthaki, M.H. (2010) *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. J. Med. Microbiol. 59, 873-880.

Krcmery, V., Barnes, A.J. (2002) Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. J. Hosp. Infect. 50, 243-260.

Lau, A., Sorrell, T.C., Chen, S., Stanley, K., Iredell, J., Halliday, C. (2008) Multiplex tandem PCR: a novel platform for rapid detection and identification of fungal pathogens from blood culture specimens. J. Clin. Microbiol. 46, 3021-3027.

Law, D., Moore, C.B., Joseph, L.A., Keaney, M.G., Denning, D.W. (1996) High incidence of antifungal drug resistance in *Candida tropicalis*. Int. J. Antimicrob. Agents 7, 241-245.

Lee, J.H., Han Y. (2011) Antiarthritic effect of Ionicerin on *Candida albicans* arthritis in mice. Arch. Pharm. Res. 34, 853-859.

Lehmann, P.F., Lin, D.M., Lasker, B.A. (1992) Genotypic Identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. J. Clin. Microbiol. 30, 3249-3254.

Liguori, G., Di Onofrio, V., Gallé, F., Lucariello, A., Albano, L., Catania, M.R., Guida, M. (2010) *Candida albicans* identification: comparison among nine phenotypic systems and a multiplex PCR. J. Prev. Med. Hyg. 51, 121-124.



- Lim, Y-H., Lee, D-H. (2002) Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. J. Microbiol. 40, 146-150.
- Lin, D., Wu, L.C., Rinaldi, M.G., Lehmann, P.F. (1995) Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. J. Clin. Microbiol. 33, 1815-1821.
- Lu, H., Marengo, M.F., Mihu, C.N., Garcia-Manero, G., Suarez-Almazor, M.E. (2012) Rare case of septic arthritis caused by *Candida krusei*: Case report and literature review. J Rheumatol. 39, 1308-1309.
- Lu, J.J., Lee, S.Y., Chiueh, T.S. (2004) *In vitro* susceptibility testing of *Candida* blood isolates and evaluation of the E-test method. J. Microbiol. Immunol. Infect. 37, 335-342.
- Luo, G., Mitchell, T.G. (2002) Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 40, 2860-2875.
- Macreadie, I.G., Johnson, G., Schlosser, T., Macreadie, P.I. (2006) Growth inhibition of *Candida* species and *Aspergillus fumigatus* by statins. FEMS Microbiol. Lett. 262, 9-13.
- Magee, B.B., D'Souza, T.M., Magee, P.T. (1987) Strain and species identification by restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal DNA repeat of *Candida* species. J Bacteriol. 169, 1639-1643.
- Majoros, L., Kardos, G., Belák, A., Maráz, A., Asztalos, L., Csánky, E., Barta, Z., Szabó, B. (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.
- Majoros, L., Kardos, G., Feiszt, P., Szabó, B. (2005) Efficacy of amphotericin B and flucytosine against fluconazole-resistant *Candida inconspicua* clinical isolates. J. Antimicrob. Chemother. 56, 253-254.
- Malani, A., Hmoud, J., Chiu, L., Carver, P.L., Bielaczyc, A., Kauffman, C.A. (2005) *Candida glabrata* fungemia: experience in a tertiary care center. Clin. Infect. Dis. 41, 975-981.
- Mannarelli, B.M., Kurtzman, C.P. (1998) Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. J. Clin. Microbiol. 36, 1634-1641.
- Mason, M.M., Lasker, B.A., Riggsby, W.S. (1987) Molecular probe for identification of medically important *Candida* species and *Torulopsis glabrata* J. Clin. Microbiol. 25, 563-566.

McLain, N., Dolan J.W. (1997) Phospholipase D activity is required for dimorphic transition in *Candida albicans*. Microbiology 143, 3521-3526.

Messer, S.A., Jones, R.N., Fritsche, T.R. (2006) International surveillance of *Candida* spp., *Aspergillus* spp.: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). J. Clin. Microbiol. 44, 1782-1787.

Mirhendi, H., Bruun, B., Schønheyder, H.C., Christensen, J.J., Fuursted, K., Gahrn-Hansen, B., Johansen, H.K., Nielsen, L., Knudsen, J.D., Arendrup, M.C. (2010) Molecular screening for *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* among Danish *Candida parapsilosis* group blood culture isolates: proposal of a new RFLP profile for differentiation. J. Med. Microbiol. 59, 414-420.

Mirhendi, H., Makimura, K., Khoramizadeh, M., Yamaguchi, H. (2006) A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. Jpn. J. Med. Mycol. 47, 225-229.

Montravers, P., Dupont, H., Gauzit, R., Veber B., Auboyer, C., Blin, P., Hennequin, C., Martin C. (2006) *Candida* as a risk factor for mortality in peritonitis. Crit. Care. Med. 34, 646-652.

Morace, G., Sanguinetti, M., Posteraro, B., Lo Cascio, G., Fadda, G. (1997) Identification of various medically important *Candida* species in clinical specimens by PCR-restriction enzyme analysis. J. Clin. Microbiol. 35, 667-672.

Moreno, A.B., del Pozo, A.M., Borja, M., and San Segudo, B. (2003) Activity of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus* against *Botrytis cinerea*. Phytopathology 93, 1344-1353.

Munguia, R., Daniel, S.J. (2008) Otological antifungals and otomycosis: a review. Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 72, 453-459.

Naglik, J.R., Challacombe, S.J., Hube, B. (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67, 400-428.

Nakase, T., Komagata, K., Fukazawa, Y. (1979) A comparative taxonomic study on two forms of *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron et Talice. J. Gen. Appl. Microbiol. 25, 375-386.

Nash, J.D., Burgess, D.S., Talbert, R.L. (2002) Effect of fluvastatin and pravastatin, HMG-CoA reductase inhibitors, on fluconazole activity against *Candida albicans*. J. Med. Microbiol. 51, 105-109.

Nazzal, D., Yasin, S., Abu-Elteen, K. (2005) A rapid PCR-based method for identification of four important *Candida* species. New Microbiol. 28, 245-250.

Nyilasi, I., Kocsubé, S., Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvolgyi, C. (2010b) Effect of different statins on the antifungal activity of polyene antimycotics. *Acta Biol. Szeged.* 54, 33-36.

Nyilasi, I., Kocsubé, S., Krizsán, K., Galgóczy, L., Pesti, M., Papp, T., Vágvolgyi, C. (2010c) In vitro synergistic interactions of the effects of various statins and azoles against some clinically important fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 307, 175-184.

Nyilasi, I., Kocsubé, S., Pesti, M., Lukács, G., Papp, T., Vágvolgyi, C. (2010a) In vitro interactions between primycin and different statins in their effects against some clinically important fungi. *J. Med. Microbiol* 59, 200-205.

Nyilasi, I., Papp, T., Csernetics, Á., Krizsán, K., Nagy, E., Vágvolgyi, Cs. (2008) High-affinity iron permease (*FTR1*) gene sequence-based molecular identification of clinically important *Zygomycetes*. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 393-397.

Odds, F. (2004) The evolution of antifungal resistance in *Candida* species. *Microbiol. Today* 31, 166-167.

Odds, F.C., Brown, A.J.P., Gow, N.A.R. (2003) Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 11, 272-279.

Orozco, A.S., Higginbotham, L.M., Hitchcock, C.A., Parkinson, T., Falconer, D., Ibrahim, A.S., Ghannoum, M.A., Filler, S.G. (1998) Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42, 2645-2649.

Ostrosky-Zeichner, L., Rex, J.H., Pappas, P.G., Hamill, R.J., Larsen, R.A., Horowitz, H.W., Powderly, W.G., Hyslop, N., Kauffman, C.A., Cleary, J., Mangino, J.E., Lee, J. (2003) Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3149-3154.

Perea, S., and Patterson, T.F. (2002) Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin. Infect. Dis.* 35, 1073-1080.

Perea, S., Gonzalez, G., Fothergill, A.W., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G. (2002b) In vitro activities of terbinafine in combination with fluconazole, itraconazole, voriconazole, and posaconazole against clinical isolates of *Candida glabrata* with decreased susceptibility to azoles. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1831-1833.

Perea, S., López-Ribot, J.L., Wickes, B.L., Kirkpatrick, W.R., Dib, O.P., Bachmann, S.P., Keller, S.M., Martinez, M., Patterson, T.F. (2002c) Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1695-1703.

Pfaller, M.A., Boyken, L., Hollis, R.J., Kroeger, J., Messer, S.A., Tendolkar, S., Diekema, D.J. (2008) *In vitro* susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. J. Clin. Microbiol. 46, 150-156.

Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Jones, R.N., Sader, H.S., Fluit, A.C., Hollis, R.J., Messer, S.A., SENTRY Participant Group (2001) International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and *in vitro* susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. J. Clin. Microbiol. 39, 3254-3259.

Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Sheehan, D.J. (2006a) Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. Clin. Microbiol. Rev. 19, 435-447.

Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Mendez, M., Kibbler, C., Erzsebet, P., Chang, S.-C., Gibbs, D.L., Newell, V.A., and the Global Antifungal Surveillance Group. (2006b) *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: Geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. J. Clin. Microbiol. 44, 3551-3556.

Pontieri, E., Caracciolo, C., Bianchini, S., Dantonio, D., Novelli, G., Dallapiccola, B., Carruba, G. (2001) Single primer pair for PCR identification of *Candida parapsilosis* group I isolates. J. Med. Microbiol. 50, 441-448.

Ramanan, N., Wang, Y. (2000) A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. Science 288, 1062-1064.

Reuter, C.W., Morgan, M.A., Bange, F.C., Gunzer, F., Eder, M., Hertenstein, B., Ganser, A. (2005) *Candida kefyr* as an emerging pathogen causing nosocomial bloodstream infections in neutropenic leukemia patients. Clin. Infect. Dis. 41, 1365-1366.

Rex, J.H., Pfaller, M.A., Barry, A.L., Nelson, P.W., Webb, C.D. (1995) Antifungal susceptibility testing of isolates from a randomized, multicenter trial of fluconazole versus amphotericin B as treatment of nonneutropenic patients with candidemia. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 40-44.

Rongioletti, F., Robert, E., Tripodi, S., Persi, A. (1992) Treatment of onychomycosis with itraconazole. J. of Dermatol. Treatment 2, 145-146.

Ryder N.S., Wagner, S., Leitner, I. (1998) *In vitro* activities of terbinafine against cutaneous isolates of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts. Antimicrob. Agents Chemother. 42, 1057-1061.

Samaranayake, L.P., Keung Leung, W., Jin, L. (2009) Oral mucosal fungal infections. *Periodontology* 2000. 49, 39-59.

Sandven, P., Bevanger, L., Digraanes, A., Haukland, H.H., Mannsaker, T., Gaustad, P. (2006) Candidemia in Norway (1991 to 2003): results from a nationwide study. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1977-1981.

Sandven, P., Nilsen, K., Digraanes, A., Tjade, T., Lassen, T. (1997) *Candida norvegensis*: a fluconazole-resistant species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1375-1376.

Sanguinetti, M., Posteraro, B., Fiori, B., Ranno, S., Torelli, R., Fadda, G. (2005) Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 668-679.

Sarvikivi, E., Lyytikäinen, O., Soll, D.R., Pujol, C., Pfaller, M.A., Richardson, M., Koukila-Kähkölä, P., Luukkainen, P., Saxén, H. (2005) Emergence of fluconazole resistance in a *Candida parapsilosis* strain that caused infections in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2729-2735.

Savini, V., Catavittello, C., Di Marzio, I., Masciarelli, G., Astolfi, D., Balbinot, A., Bianco, A., Pompilio, A., Di Bonaventura, G., D'Amario, C., D'Antonio, D. (2010b) Pan-azole-resistant *Candida guilliermondii* from a leukemia patient's silent funguria. *Mycopathologia* 169, 457-459.

Savini, V., Catavittello, C., Onofrillo, D., Masciarelli, G., Astolfi, D., Balbinot, A., Febbo, F., D'Amario, C., D'Antonio, D. (2010a) What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. *Mycoses* 54, 434-441.

Scherer, S., Stevens D.A. (1987) Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 25, 675-679.

Schmidt, M., Dzogbeta, S., Boyer, M.P. (2009) Inhibition of *Candida albicans* by fluvastatin is dependent on pH. *Res. Lett. Biochem.* 2009: ID 151424

Segal, E. (2005) *Candida*, still number one- what do we know and where are we going from there? *Mycoses* 48, 3-11.

Steffan, P., Vazquez, J.A., Boikov, D., Xu, C., Sobel, J.D., Akins, R.A. (1997) Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2031-2039.

St-Germain, G., Laverdiere, M., Pelletier, R., Bourgault, A.M., Libman, M., Lemieux, C., Noel, G. (2001) Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2-year (1996 to 1998) multicenter surveillance study in Quebec, Canada. *J. Clin. Microbiol.* 39, 949-953.

Sun, R.L., Jones, D.B., Wilhelmus K.R. (2007) Clinical characteristics and outcome of *Candida* keratitis. *Am J Ophthalmol.* 143, 1043-1045.

Szabó, Z., Sóczó, G., Miszti, C., Hermann, P., Rozgonyi, F. (2008a) *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.

Szabó, Z., Tóth, B., Kovács, M., Kardos, G., Maráz, A., Rozgonyi, F., Majoros, L. (2008b) Evaluation of the new Micronaut-Candida system compared to the API ID32C method for yeast identification. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1824-1825.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evolution* 28, 2731-2739.

Tarini, N.M.A., Wahid, M.H., Ibrahim, F., Yasmon, A., Djauzi, S. (2010) Development of multiplex-PCR assay for rapid detection of *Candida spp.* *Med. J. Indones.* 19, 83-87.

Tavanti, A., Davidson, A.D., Gow, N.A., Maiden, M.C.J., Odds, F.C. (2005) *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J. Clin. Microbiol.* 43, 284-292.

Thanos, M., Schonian, G., Meyer, W., Schweynoch, C., Graser, Y., Mitchell, T.G., Presber, W., Tietz, H.J. (1996) Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34, 615–621.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997) The clustal x windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 25, 4876–4882.

Tortorano, A.M., Kibbler, C., Perman, J., Bernhardt, H., Klingspor, L., Grillot, R. (2006) Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* 27, 359-366.

Tortorano, A.M., Peman, J., Bernhardt, H., Klingspor, L., Kibbler, C.C., Faure, O., Biraghi, E., Canton, E., Zimmermann, K., other authors (2004) Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28 month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23, 317-322.

Trofa, D., Gácsér, A., Nosanchuk, J.D. (2008) *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 21, 606-625.

Upton, A., Rogers, K., Wood, N., Morris, A.J. (2004) Antifungal susceptibility of non-albicans *Candida* species causing fingernail onychomycosis. New Zeal. Med. J. 117(1201):U1060.

Vályi-Nagy, T., Uri, J., Szilágyi, I. (1954) Primycin, a new antibiotic. Nature 174, 1105-1006.

van Asbeck, E.C., Clemons, K.V., Stevens, D.A. (2009) *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. Crit. Rev. Microbiol. 35, 283-309.

Vanden Bossche, H., Engelen, M., Rochette, F. (2003) Antifungal agents of use in animal health - chemical, biochemical and pharmacological aspects. J. Vet. Pharmacol. Ther. 26, 5-29.

Vanzzini Zago, V., Alcantara Castro, M., Naranjo Tackman, R. (2012) Support of the laboratory in the diagnosis of fungal ocular infections. Int. J. Inflam. Article ID 643104, 8 pages

Weichert, S., Reinshagen, K., Zahn, K., Geginat, G., Dietz, A., Kilian, A.K., Schroten, H., Tenenbaum, T. (2012) Candidiasis caused by *Candida kefyr* in a neonate: case report. BMC Infect. Dis. 18;12:61.

White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B., Taylor, J.W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA for phylogenetics. In PCR protocols: a guide to the methods and applications, 315-322. Edited by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. New York: Academic Press.

Yang, Y.L., Ho, Y.A., Cheng, H.H., Ho, M., Lo, H.J. (2004) Susceptibilities of *Candida* species to amphotericin B and fluconazole: the emergence of fluconazole resistance in *Candida tropicalis*. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 25, 60-64.


Yapar, N., Uysal, U., Yucesoy, M., Cakir, N., Yuce, A. (2006) Nosocomial bloodstream infections associated with *Candida* species in a Turkish University Hospital. Mycoses 49, 134-138.


Zimmermann, T., Yeates, R. A., Laufen, H., Pfaff, G., Wildfeuer, A. (1994) Influence of concomitant food intake on the oral absorption of two triazole antifungal agents, itraconazole and fluconazole. Eur. J. Clin. Pharmacol. 46, 147-150.


## 10. Mellékletek


A táblázatokban a kontroll növekedéséhez (100%) viszonyított, átlagolt gátlási százalékokat ábrázoltuk, és feltüntettük a fontosabb kölcsönhatásokat, illetve az azokhoz kötődő gátlási százalékok közötti szórásokat.

### Jelmagyarázat:

 = 90% feletti gátlás

 = 50% és 90% közötti gátlás

 = 20% és 50% közötti gátlás

 = 20% alatti gátlás

**Sz** = Szinergista kölcsönhatás (IR >1,5)

**A** = Additív kölcsönhatás (IR 0,5-1,5)

**Ant** = Antagonista kölcsönhatás (IR <0,5)



**Az antifungális szerek és a sztatinok kölcsönhatásainak vizsgálata *C. parapsilosis* CBS 604 izolátum esetében**

**1. Melléklet.** Az amfotericin B/szimvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. parapsilosis* esetében

											SZIM Konc.
100	100	100	100	86	A 59±3,9%	27	21	20	21	25	25 µg/ml
100	100	100	100	85	A 58±4,2%	27	19	7	6	10	12,5 µg/ml
100	100	100	100	85	Sz 60±4,5%	23	14	7	7	3	6,25 µg/ml
100	100	100	100	84	Sz 59±2,9%	27	11	6	3	0	3,125 µg/ml
100	100	100	100	88	Sz 58±3,7%	30	13	9	4	0	1,56 µg/ml
100	100	100	100	87	Sz 59±3,9%	25	16	7	6	0	0,78 µg/ml
100	100	100	100	88	Sz 58±3,4%	32	17	9	3	0	0,39 µg/ml
100	100	100	100	73	38	32	12	3	4	0	0 µg/ml
AMB Konc.	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml

**2. Melléklet.** Az amfotericin B/fluvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. parapsilosis* esetében

											FLUV Konc.
100	100	100	100	Sz 92±1,4%	A 50±2,7%	48	27	15	15	18	25 µg/ml
100	100	100	100	Sz 93±1,3%	A 53±2,3%	49	23	14	17	8	12,5 µg/ml
100	100	100	100	Sz 94±0,9%	A 55±2,5%	Sz 54±1,2%	33	22	17	0	6,25 µg/ml
100	100	100	100	Sz 93±1,1%	A 58±1,4%	Sz 53±1,7%	45	31	19	0	3,125 µg/ml
100	100	100	100	Sz 94±0,9%	Sz 71±1,7%	Sz 59±2,1%	Sz 51±0,6%	34	18	0	1,56 µg/ml
100	100	100	100	Sz 95±0,5%	Sz 79±1,1%	Sz 60±2,5%	Sz 55±1,2%	39	23	0	0,78 µg/ml
100	100	100	100	Sz 96±0,7%	Sz 79±1,8%	Sz 66±2,7%	Sz 52±1,1%	40	22	0	0,39 µg/ml
100	100	100	100	50	42	33	27	16	16	0	0 µg/ml
AMB Konc.	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml

**3. Melléklet.** Az amfotericin B/atorvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. parapsilosis* esetében

												ATOR Konc.
AMB Konc.	100	100	100	100	Sz 96±0,2%	Sz 70±1,2%	Sz 64±0,6%	Sz 41±2,4%	17	12	1	25 µg/ml
	100	100	100	100	Sz 96±03, %	Sz 70±0,7%	Sz 57±0,5%	Sz 42±2,7%	13	15	2	12,5 µg/ml
	100	100	100	100	Sz 99±0,7%	Sz 70±0,9%	Sz 57±0,2%	Sz 43±1,9%	18	19	1	6,25 µg/ml
	100	100	100	100	Sz 100	Sz 70±0,8%	Sz 55±0,4%	Sz 42±0,7%	17	15	3	3,125 µg/ml
	100	100	100	100	Sz 100	Sz 74±0,7%	Sz 58±0,4%	Sz 42±0,5%	17	19	1	1,56 µg/ml
	100	100	100	100	Sz 100	Sz 76±0,4%	Sz 60±0,7%	Sz 42±0,7%	16	19	3	0,78 µg/ml
	100	100	100	100	Sz 100	Sz 75±0,2%	A 49±0,6%	Sz 43±0,6%	17	15	0	0,39 µg/ml
	100	100	100	100	57	37	34	21	16	10	0	0 µg/ml
	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml	

**4. Melléklet.** Az amfotericin B/roszuvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. parapsilosis* esetében

												ROSU Konc.
AMB Konc.	100	100	100	100	Sz 79±0,8%	Sz 48±2,9%	Sz 33±3,1%	Sz 26±3,0%	9	9	0	25 µg/ml
	100	100	100	100	Sz 74±1,9%	Sz 49±3,8%	Sz 37±3,9%	Sz 25±3,9%	7	10	0	12,5 µg/ml
	100	100	100	100	Sz 74±3,1%	Sz 47±3,6%	Sz 36±4,0%	Sz 25±3,7%	10	9	0	6,25 µg/ml
	100	100	100	100	Sz 76±4,8%	Sz 49±5,3%	Sz 34±4,1%	Sz 24±3,1%	8	7	0	3,125 µg/ml
	100	100	100	100	Sz 78±2,4%	Sz 50±5,4%	Sz 37±6,5%	Sz 27±3,4%	9	9	0	1,56 µg/ml
	100	100	100	100	Sz 73±2,6%	A 44±5,4%	Sz 31±5,5%	19	5	5	0	0,78 µg/ml
	100	100	100	100	A 59±0,3%	A 45±4,8%	Sz 31±4,9%	14	3	5	0	0,39 µg/ml
	100	100	100	100	54	31	14	1	1	1	0	0 µg/ml
	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml	

**5. Melléklet.** A flukonazol/szimvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. parapsilosis* esetében

											SZIM Konc.
100	100	100	100	100	100	A 94±2,1%	A 36±1,0%	A 36±0,7%	21	22	25 µg/ml
100	100	100	100	100	100	A 90±0,4%	A 23±1,7%	21	17	6	12,5 µg/ml
100	100	100	100	100	100	A 85±1,4%	11	18	10	6	6,25 µg/ml
100	100	100	100	100	100	75	9	8	7	1	3,125 µg/ml
100	100	100	100	100	100	68	9	7	4	0	1,56 µg/ml
100	100	100	100	100	100	63	7	7	5	0	0,78 µg/ml
100	100	100	100	100	100	62	8	7	3	0	0,39 µg/ml
100	100	100	100	100	100	63	10	9	4	0	0 µg/ml
FLUK Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml

**6. Melléklet.** A flukonazol/fluvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. parapsilosis* esetében

											FLUV Konc.
100	100	100	100	100	100	A 100	Sz 65±3,3%	A 36±4,2%	16	15	25 µg/ml
100	100	100	100	100	100	A 91±4,4%	A 33±3,2%	17	7	7	12,5 µg/ml
100	100	100	100	100	100	A 90±3,2%	33	12	8	0	6,25 µg/ml
100	100	100	100	100	100	87	31	14	8	0	3,125 µg/ml
100	100	100	100	100	100	79	31	9	9	0	1,56 µg/ml
100	100	100	100	100	100	87	31	10	8	0	0,78 µg/ml
100	100	100	100	100	100	80	27	9	9	0	0,39 µg/ml
100	100	100	100	100	100	79	30	11	5	0	0 µg/ml
FLUK Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml

**7. Melléklet.** A flukonazol/atorvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. parapsilosis* esetében

							ATOR Konc.				
100	100	100	100	100	100	A 93±1,0%	46	23	7	3	25 µg/ml
100	100	100	100	100	100	83	40	24	6	1	12,5 µg/ml
100	100	100	100	100	100	81	40	22	6	2	6,25 µg/ml
100	100	100	100	100	100	82	44	24	7	2	3,125 µg/ml
100	100	100	100	100	100	74	47	23	9	1	1,56 µg/ml
100	100	100	100	100	100	77	46	23	8	0	0,78 µg/ml
100	100	100	100	100	100	80	46	23	7	0	0,39 µg/ml
100	100	100	100	100	100	78	48	21	8	0	0 µg/ml
FLUK Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml

**8. Melléklet.** A nystatin/fluvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. parapsilosis* esetében

							FLUV Konc.				
100	100	100	A 52±0,3%	23	12	12	13	14	14	12	25 µg/ml
100	100	100	Sz 55±1,1%	23	11	11	8	7	8	3	12,5 µg/ml
100	100	100	Sz 56±3,9%	24	10	9	7	4	4	1	6,25 µg/ml
100	100	100	Sz 56±2,0%	25	10	13	6	3	5	0	3,125 µg/ml
100	100	100	Sz 55±1,3%	25	11	13	6	4	2	0	1,56 µg/ml
100	100	100	Sz 58±2,3%	26	14	9	9	6	2	0	0,78 µg/ml
100	100	100	Sz 54±1,9%	22	12	9	8	4	2	0	0,39 µg/ml
100	100	100	30	19	14	13	7	3	1	0	0 µg/ml
NYS Konc.	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml

**9. Melléklet.** A terbinafin/szimvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. parapsilosis* esetében

											SZIM Konc.
100	100	100	A 86±1,1%	A 64±0,9%	35	22	21	24	25	23	25 µg/ml
100	100	100	A 80±0,3%	A 58±1,1%	33	20	21	15	13	8	12,5 µg/ml
100	100	100	A 81±0,5%	Sz 59±0,7%	28	21	20	12	9	0	6,25 µg/ml
100	100	100	A 76±0,3%	46	25	24	21	15	10	0	3,125 µg/ml
100	100	100	A 70±0,4%	26	28	23	21	18	10	0	1,56 µg/ml
100	100	100	66	46	29	21	21	17	9	0	0,78 µg/ml
100	100	100	64	40	36	24	20	15	10	0	0,39 µg/ml
100	100	100	65	33	29	23	20	17	10	0	0 µg/ml
TER Konc.	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml

**10. Melléklet.** A terbinafin/fluvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. parapsilosis* esetében

											FLUV Konc.
100	100	100	A 97±0,2%	A 73±0,8%	39	29	29	23	18	15	25 µg/ml
100	100	100	A 92±0,7%	A 53±1,0%	37	27	24	21	20	6	12,5 µg/ml
100	100	100	A 85±0,7%	A 51±1,1%	38	31	28	26	19	3	6,25 µg/ml
100	100	100	72	43	34	27	26	27	20	0	3,125 µg/ml
100	100	100	64	41	38	27	28	23	19	0	1,56 µg/ml
100	100	100	67	45	42	36	25	25	17	0	0,78 µg/ml
100	100	100	67	43	36	28	27	27	18	0	0,39 µg/ml
100	100	100	62	42	40	32	31	25	19	0	0 µg/ml
TER Konc.	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml

**11. Melléklet.** A terbinafin/atorvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. parapsilosis* esetében

											ATOR Konc.
100	100	100	91	Sz 70±2%	Sz 51±2,7%	33	19	12	7	1	25 µg/ml
100	100	100	91	Sz 70±1,9%	Sz 50±2,3%	34	19	12	6	4	12,5 µg/ml
100	100	100	90	Sz 78±1,5%	Sz 51±2,7%	33	18	12	5	4	6,25 µg/ml
100	100	100	91	Sz 71±1,4%	Sz 51±3,0%	27	19	12	5	3	3,125 µg/ml
100	100	100	91	Sz 71±2,7%	Sz 51±3,7%	33	18	11	7	3	1,56 µg/ml
100	100	100	92	Sz 72±2,8%	Sz 55±3,3%	37	17	20	8	4	0,78 µg/ml
100	100	100	88	Sz 67±1,3%	Sz 52±2,4%	35	15	17	6	0	0,39 µg/ml
100	100	100	82	43	28	21	12	9	3	1	0 µg/ml
TER Konc.	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml

**12. Melléklet.** A terbinafin/roszuvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. parapsilosis* esetében

											ROSU Konc.
100	100	100	86	A 61±3,2%	24	24	14	16	11	0	25 µg/ml
100	100	100	83	A 56±4,6%	28	24	12	11	12	0	12,5 µg/ml
100	100	100	85	A 57±6,3%	27	21	11	13	12	0	6,25 µg/ml
100	100	100	85	A 54±6,2%	26	23	11	13	12	0	3,125 µg/ml
100	100	100	86	A 54±4,5%	24	23	12	12	13	0	1,56 µg/ml
100	100	100	86	A 55±5,4%	28	23	19	12	10	0	0,78 µg/ml
100	100	100	84	A 54±6,4%	32	24	16	17	12	0	0,39 µg/ml
100	100	100	80	47	25	22	16	14	10	0	0 µg/ml
TER Konc.	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml

**13. Melléklet.** A terbinafin/pravasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. parapsilosis* esetében

											PRAV Konc.
100	100	100	79	A 65±1,7%	47	35	23	22	22	0	25 µg/ml
100	100	100	75	A 58±2,1%	42	32	25	20	22	0	12,5 µg/ml
100	100	100	78	A 59±3,7%	36	35	24	22	21	0	6,25 µg/ml
100	100	100	82	A 58±1,3%	49	37	31	24	20	0	3,125 µg/ml
100	100	100	81	A 57±1,1%	48	40	33	29	23	0	1,56 µg/ml
100	100	100	84	A 58±0,8%	43	35	30	28	22	0	0,78 µg/ml
100	100	100	83	A 51±1,5%	47	41	38	24	22	0	0,39 µg/ml
100	100	100	70	49	41	30	19	13	8	0	0 µg/ml
TER Konc.	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml

**14. Melléklet.** A primycin/szimvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. parapsilosis* esetében

											SZIM Konc.
100	100	Sz 94±0,2%	Sz 85±0,5%	Sz 40±1,0%	23	22	20	21	20	23	25 µg/ml
100	100	Sz 87±0,2%	Sz 31±1,4%	9	8	8	7	9	7	5	12,5 µg/ml
100	100	Sz 68±0,3%	10	7	7	9	5	6	5	2	6,25 µg/ml
100	100	Sz 21±0,9%	10	8	7	10	8	9	9	2	3,125 µg/ml
100	100	13	9	8	8	9	9	9	9	3	1,56 µg/ml
100	100	11	9	9	9	5	7	10	9	0	0,78 µg/ml
100	100	9	6	7	8	4	5	10	8	0	0,39 µg/ml
100	100	6	4	4	2	3	3	4	3	0	0 µg/ml
PRI Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml

**15. Melléklet.** A primycin/fluvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. parapsilosis* esetében

											FLUV Konc.
100	100	Sz 96±0,5%	Sz 79±3,5%	29	18	17	16	16	15	16	25 µg/ml
100	100	48	3	2	3	3	4	1	1	4	12,5 µg/ml
100	100	8	2	2	4	2	3	1	2	4	6,25 µg/ml
100	100	4	2	2	4	2	4	2	4	4	3,125 µg/ml
100	100	7	4	3	5	5	4	7	3	5	1,56 µg/ml
100	100	5	3	5	6	2	7	4	6	4	0,78 µg/ml
100	100	7	3	4	8	2	8	4	6	2	0,39 µg/ml
100	100	5	2	2	4	5	2	2	1	0	0 µg/ml
PRI Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml

**16. Melléklet.** A primycin/atorvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. parapsilosis* esetében

											ATOR Konc.
100	Ant 18±,32%	5	3	4	3	4	4	5	2	2	25 µg/ml
100	61	3	2	3	5	5	3	4	2	1	12,5 µg/ml
100	78	4	2	7	8	7	6	7	5	2	6,25 µg/ml
100	96	3	2	5	8	8	8	4	5	1	3,125 µg/ml
100	100	5	2	6	8	7	9	9	7	1	1,56 µg/ml
100	100	4	4	8	10	10	9	9	5	2	0,78 µg/ml
100	100	8	3	6	8	9	8	8	3	0	0,39 µg/ml
100	100	7	2	2	6	6	4	4	1	0	0 µg/ml
PRI Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml



**Az antifungális szerek és a sztatinok kölcsönhatásainak vizsgálata *C. guilliermondii* CBS 566 izolátum esetében**

**17. Melléklet.** Az amfotericin B/lovasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. guilliermondii* esetében

											LOVA Konc.
100	100	100	Sz 58±3,9%	13	14	7	10	8	5	4	25 µg/ml
100	100	100	Sz 57±3,3%	11	12	8	7	9	6	5	12,5 µg/ml
100	100	100	Sz 57±2,4%	8	8	7	6	9	6	4	6,25 µg/ml
100	100	100	Sz 59±4,5%	7	5	6	5	9	4	4	3,125 µg/ml
100	100	100	15	7	6	5	6	5	4	5	1,56 µg/ml
100	100	100	11	4	5	9	7	6	7	4	0,78 µg/ml
100	100	100	12	8	2	8	9	9	6	0	0,39 µg/ml
100	100	100	9	6	6	6	5	5	2	0	0 µg/ml
AMB Konc.	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml

**18. Melléklet.** Az amfotericin B/szimvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. guilliermondii* esetében

											SZIM Konc.
100	100	100	Sz 78±0,3%	28	18	15	15	15	15	14	25 µg/ml
100	100	100	Sz 78±1,0%	27	8	7	6	7	7	5	12,5 µg/ml
100	100	100	Sz 80±0,9%	28	8	7	7	8	8	0	6,25 µg/ml
100	100	100	Sz 82±1,9%	31	8	5	5	8	9	0	3,125 µg/ml
100	100	100	Sz 82±1,7%	29	9	7	6	7	7	0	1,56 µg/ml
100	100	100	Sz 82±0,3%	24	9	9	6	9	7	0	0,78 µg/ml
100	100	100	Sz 63±1,2%	14	9	8	8	8	8	0	0,39 µg/ml
100	100	100	21	6	9	8	6	8	6	0	0 µg/ml
AMB Konc.	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml

**19. Melléklet.** Az amfotericin B/atorvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. guilliermondii* esetében

ATOR Konc.											
100	100	100	Sz 100	26	13	5	7	6	6	0	25 µg/ml
100	100	100	Sz 100	28	16	7	7	3	4	0	12,5 µg/ml
100	100	100	Sz 100	22	20	9	6	4	4	0	6,25 µg/ml
100	100	100	Sz 100	24	20	5	2	7	8	0	3,125 µg/ml
100	100	100	Sz 100	24	16	5	3	2	3	0	1,56 µg/ml
100	100	100	Sz 100	24	19	8	2	3	1	0	0,78 µg/ml
100	100	100	Sz 93±1,1%	14	14	5	2	2	0	0	0,39 µg/ml
100	100	100	16	10	6	6	3	4	4	0	0 µg/ml
AMB Konc.	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml

**20. Melléklet.** Az amfotericin B/roszuvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. guilliermondii* esetében

ROSU Konc.											
100	100	100	Sz 84±1,7%	26	10	9	7	5	3	0	25 µg/ml
100	100	100	Sz 84±1,5%	25	9	14	8	6	6	0	12,5 µg/ml
100	100	100	Sz 89±0,7%	27	11	12	10	7	7	1	6,25 µg/ml
100	100	100	Sz 89±1,2%	20	20	11	8	8	8	0	3,125 µg/ml
100	100	100	Sz 74±1,2%	13	13	10	4	2	2	0	1,56 µg/ml
100	100	100	20	8	10	9	6	9	9	1	0,78 µg/ml
100	100	100	16	12	8	9	8	7	7	1	0,39 µg/ml
100	100	100	13	2	3	4	2	2	2	0	0 µg/ml
AMB Konc.	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml

**21. Melléklet.** A flukonazol/szimvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. guilliermondii* esetében

											SZIM Konc.
100	100	100	A 100	Sz 94±7,3%	15	15	14	12	13	12	25 µg/ml
100	100	100	A 100	Sz 94±3,5%	5	6	5	3	2	2	12,5 µg/ml
100	100	100	A 100	Sz 92±3,6%	5	3	4	3	4	1	6,25 µg/ml
100	100	100	A 100	Sz 95±4,2%	5	5	6	3	2	0	3,125 µg/ml
100	100	100	A 100	Sz 76±4,1%	5	7	5	2	2	0	1,56 µg/ml
100	100	100	A 100	Sz 81±2,0%	5	4	4	2	2	0	0,78 µg/ml
100	100	100	A 100	Sz 56±3,7%	5	5	4	2	1	0	0,39 µg/ml
100	100	100	74	30	6	6	4	1	3	0	0 µg/ml
FLUK Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml

**22. Melléklet.** A flukonazol/fluvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. guilliermondii* esetében

FLUV Konc.											
100	100	100	A 100	Sz 100	Sz 64±0,7%	27	29	20	22	13	25 µg/ml
100	100	100	A 100	Sz 73±1,6%	21	26	29	17	12	9	12,5 µg/ml
100	100	100	A 100	25	21	28	25	16	4	4	6,25 µg/ml
100	100	100	A 100	20	22	27	27	12	8	5	3,125 µg/ml
100	100	100	A 100	16	22	27	24	14	8	4	1,56 µg/ml
100	100	100	A 100	18	23	29	22	13	13	6	0,78 µg/ml
100	100	100	A 95±0,4%	16	23	31	23	15	11	0	0,39 µg/ml
100	100	100	69	20	21	34	5	9	8	0	0 µg/ml
FLUK Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml

**23. Melléklet.** A flukonazol/atorvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. guilliermondii* esetében

											ATOR Konc.
100	100	100	67	A 57±0,8%	39	38	22	14	10	0	25 µg/ml
100	100	100	68	A 54±1,0%	37	37	19	12	12	0	12,5 µg/ml
100	100	100	70	A 51±3,7%	39	40	18	11	12	0	6,25 µg/ml
100	100	100	70	A 50±4,6%	43	39	15	13	15	0	3,125 µg/ml
100	100	100	68	A 50±4,5%	37	39	17	17	12	0	1,56 µg/ml
100	100	100	71	A 53±1,9%	35	34	18	17	12	0	0,78 µg/ml
100	100	100	67	39	47	44	18	18	18	0	0,39 µg/ml
100	100	100	63	40	33	31	9	7	6	0	0 µg/ml
FLUK Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml

**24. Melléklet.** Az itraconazol/lovasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. guilliermondii* esetében

											LOVA Konc.
100	100	100	100	100	100	100	A 95±2,0%	39	27	12	25 µg/ml
100	100	100	100	100	100	100	A 80±2,1%	36	34	13	12,5 µg/ml
100	100	100	100	100	100	100	A 78±1,1%	37	29	12	6,25 µg/ml
100	100	100	100	100	100	100	A 76±2,0%	31	26	12	3,125 µg/ml
100	100	100	100	100	100	100	A 72±4,5%	39	30	9	1,56 µg/ml
100	100	100	100	100	100	100	62	31	23	10	0,78 µg/ml
100	100	100	100	100	100	100	65	33	26	6	0,39 µg/ml
100	100	100	100	100	100	100	65	36	24	7	0 µg/ml
ITRA Konc.	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml

**25. Melléklet.** Az itraconazol/szimvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. guilliermondii* esetében

										SZIM Konc.	
100	100	100	100	100	100	100	A 100	Sz 100	Sz 70±5,6%	12	25 µg/ml
100	100	100	100	100	100	100	A 100	Sz 100	Sz 63±3,9%	11	12,5 µg/ml
100	100	100	100	100	100	100	A 100	Sz 100	36	1	6,25 µg/ml
100	100	100	100	100	100	100	A 100	Sz 95±3,1%	36	0	3,125 µg/ml
100	100	100	100	100	100	100	A 97±1,1%	Sz 97±0,8%	22	0	1,56 µg/ml
100	100	100	100	100	100	100	A 97±1,5%	Sz 94±2,5%	32	3	0,78 µg/ml
100	100	100	100	100	100	100	A 98±1,5%	Sz 77±2,6%	25	0	0,39 µg/ml
100	100	100	100	100	100	100	72	39	12	0	0 µg/ml
ITRA Konc.	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml

**26. Melléklet.** Az itraconazol/fluvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. guilliermondii* esetében

										FLUV Konc.	
100	100	100	100	100	100	100	A 97±2,6%	Sz 56±0,9%	11	12	25 µg/ml
100	100	100	100	100	100	100	88	27	10	6	12,5 µg/ml
100	100	100	100	100	100	100	76	15	10	1	6,25 µg/ml
100	100	100	100	100	100	100	78	15	9	0	3,125 µg/ml
100	100	100	100	100	100	100	77	19	13	0	1,56 µg/ml
100	100	100	100	100	100	100	77	17	15	0	0,78 µg/ml
100	100	100	100	100	100	100	87	19	16	0	0,39 µg/ml
100	100	100	100	100	100	100	89	20	11	0	0 µg/ml
ITRA Konc.	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml

**27. Melléklet.** Az itrakonazol/atorvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. guilliermondii* esetében

	ATOR Konc.											
ITRA Konc.	100	100	100	100	100	100	100	A 100	Sz 100	Sz 100	0	25 µg/ml
	100	100	100	100	100	100	100	A 100	Sz 100	Sz 100	0	12,5 µg/ml
	100	100	100	100	100	100	100	A 100	Sz 100	Sz 100	0	6,25 µg/ml
	100	100	100	100	100	100	100	A 100	Sz 100	Sz 100	0	3,125 µg/ml
	100	100	100	100	100	100	100	A 100	Sz 97±2,5%	Sz 97±0,7%	0	1,56 µg/ml
	100	100	100	100	100	100	100	A 100	Sz 95±3,6%	Sz 96±1,2%	0	0,78 µg/ml
	100	100	100	100	100	100	100	A 93±5,4%	Sz 66±8,5%	Sz 57±7,0%	0	0,39 µg/ml
	100	100	100	100	100	100	100	77	28	18	0	0 µg/ml
	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml	

**28. Melléklet.** A nystatin/lovasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. guilliermondii* esetében

LOVA Konc.												
NYS Konc.	100	100	100	A 63±3,3%	11	11	13	15	13	8	10	25 µg/ml
	100	100	100	A 63±2,7%	10	10	11	16	15	7	10	12,5 µg/ml
	100	100	100	A 60±1,3%	8	13	16	17	16	13	9	6,25 µg/ml
	100	100	100	57	8	14	18	14	15	14	8	3,125 µg/ml
	100	100	100	54	9	17	12	14	16	13	7	1,56 µg/ml
	100	100	100	52	7	14	16	16	12	15	1	0,78 µg/ml
	100	100	100	53	10	16	11	15	12	12	1	0,39 µg/ml
	100	100	100	51	11	13	14	12	11	6	0	0 µg/ml
	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml	

**29. Melléklet.** A terbinafin/lovasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. guilliermondii* esetében

											LOVA Konc.
100	100	100	A 22±7,5%	19	11	16	14	15	14	2	25 µg/ml
100	100	100	Sz 52±4,5%	18	21	17	12	10	19	2	12,5 µg/ml
100	100	100	Sz 60±4,4%	18	20	21	18	17	19	2	6,25 µg/ml
100	100	100	Sz 52±1,7%	26	24	24	19	18	19	1	3,125 µg/ml
100	100	100	Sz 54±1,3%	23	26	22	19	16	17	1	1,56 µg/ml
100	100	100	Sz 40±3,8%	25	21	20	19	18	14	0	0,78 µg/ml
100	100	100	22	21	14	20	17	15	10	0	0,39 µg/ml
100	100	100	21	16	6	10	5	6	2	0	0 µg/ml
TER Konc.	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml

**30. Melléklet.** A terbinafin/szimvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. guilliermondii* esetében

											SZIM Konc.
100	100	100	Sz 64±6,0%	38	21	10	10	10	8	12	25 µg/ml
100	100	100	Sz 70±6,1%	41	22	14	9	9	9	7	12,5 µg/ml
100	100	100	Sz 61±2,7	35	25	10	10	8	8	1	6,25 µg/ml
100	100	100	Sz 60±4,6	34	14	13	9	7	10	0	3,125 µg/ml
100	100	100	Sz 55±4,5	41	18	12	10	9	8	0	1,56 µg/ml
100	100	100	Sz 52±1,5	38	15	11	13	11	8	0	0,78 µg/ml
100	100	100	39	21	14	15	12	11	10	0	0,39 µg/ml
100	100	100	33	10	9	10	11	11	8	0	0 µg/ml
TER Konc.	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml

**31. Melléklet.** A terbinafin/fluvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. guilliermondii* esetében

											FLUV Konc.
100	100	100	Sz 72±3,7%	40	23	15	13	11	9	7	25 µg/ml
100	100	100	Sz 65±0,9%	34	21	13	10	12	8	5	12,5 µg/ml
100	100	100	Sz 64±4,3%	37	22	15	9	11	9	1	6,25 µg/ml
100	100	100	Sz 66±4,1%	39	22	15	12	9	6	0	3,125 µg/ml
100	100	100	Sz 67±2,8%	41	25	18	14	11	8	0	1,56 µg/ml
100	100	100	46	40	25	19	17	13	8	0	0,78 µg/ml
100	100	100	39	34	26	19	14	11	8	0	0,39 µg/ml
100	100	100	31	28	17	15	13	13	9	0	0 µg/ml
TER Konc.	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml

**32. Melléklet.** A terbinafin/roszuvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. guilliermondii* esetében

											ROSU Konc.
100	100	100	A 57±4,0%	31	31	17	14	18	16	1	25 µg/ml
100	100	100	A 55±3,2%	31	28	15	14	14	10	1	12,5 µg/ml
100	100	100	A 54±2,6%	32	27	19	13	11	11	1	6,25 µg/ml
100	100	100	A 57±4,5%	34	26	18	16	16	12	0	3,125 µg/ml
100	100	100	A 58±2,1%	36	28	18	20	18	14	1	1,56 µg/ml
100	100	100	A 59±2,0%	32	31	15	20	19	18	0	0,78 µg/ml
100	100	100	A 56±3,6%	31	32	16	20	19	15	0	0,39 µg/ml
100	100	100	38	27	21	13	16	19	14	0	0 µg/ml
TER Konc.	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml



**33. Melléklet.** A primycin/szimvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. guilliermondii* esetében

											SZIM Konc.	
100	Ant 26±2,5%	8	8	9	7	7	8	9	5	7	25 µg/ml	
100	A 76±1,7%	5	4	6	4	4	5	7	4	4	12,5 µg/ml	
100	A 90±1,4%	5	7	4	5	3	5	4	4	3	6,25 µg/ml	
100	100	3	4	6	5	5	4	4	5	4	3,125 µg/ml	
100	100	3	3	4	6	5	5	6	4	3	1,56 µg/ml	
100	100	5	2	5	5	7	5	5	4	0	0,78 µg/ml	
100	100	1	2	2	5	5	2	4	3	0	0,39 µg/ml	
100	100	2	1	2	3	4	4	4	1	0	0 µg/ml	
PRI Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml	

**34. Melléklet.** A primycin/fluvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. guilliermondii* esetében

											Fluv. Konc.	
100	Ant 37±7,2%	8	7	10	9	7	8	7	5	7	25 µg/ml	
100	A 77±5,3%	7	6	10	9	6	8	5	4	6	12,5 µg/ml	
100	92	13	14	13	7	8	8	5	4	6	6,25 µg/ml	
100	100	11	15	11	6	7	5	6	4	6	3,125 µg/ml	
100	100	11	11	10	5	8	8	7	9	1	1,56 µg/ml	
100	100	7	3	9	4	7	6	9	5	0	0,78 µg/ml	
100	100	9	0	1	7	6	9	6	6	0	0,39 µg/ml	
100	100	0	0	1	0	4	4	2	3	0	0 µg/ml	
PRI Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml	

**35. Melléklet.** A primycin/atorvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. guilliermondii* esetében

		ATOR Konc.									
100	Ant 10±4,4%	7	8	4	6	6	7	7	5	2	25 µg/ml
100	Ant 41±5,8%	7	9	9	10	9	8	9	4	2	12,5 µg/ml
100	A 73±2,0%	16	10	14	11	12	12	10	6	2	6,25 µg/ml
100	A 80±3,1%	17	16	10	11	12	11	12	5	3	3,125 µg/ml
100	92	16	7	13	10	10	12	12	5	0	1,56 µg/ml
100	100	16	5	3	4	9	10	9	2	3	0,78 µg/ml
100	100	17	4	4	4	6	4	4	2	0	0,39 µg/ml
100	100	9	5	5	3	4	5	5	1	0	0 µg/ml
PRI Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml

**Az antifungális szerek és a sztatinok kölcsönhatásainak vizsgálata *C. tropicalis* CBS 94 izolátum esetében**

**36. Melléklet.** Az amfotericin B/szimvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											SZIM Konc.
100	100	100	68	A 65±0,5%	A 61±4,2%	A 60±0,9%	A 57±4,0%	A 52±1,2%	A 52±1,1%	42	25 µg/ml
100	100	100	67	A 65±2,7%	52	A 47±4,3%	A 42±2,7%	A 41±3,5%	A 39±4,7%	29	12,5 µg/ml
100	100	100	68	A 66±3,3%	51	A 32±0,4%	A 31±3,7%	A 22±5,3%	A 23±2,3%	23	6,25 µg/ml
100	100	100	71	A 65±0,9%	52	24	28	14	16	20	3,125 µg/ml
100	100	100	67	A 64±2,7%	51	28	24	13	8	4	1,56 µg/ml
100	100	100	69	52	52	30	22	13	9	0	0,78 µg/ml
100	100	100	70	52	51	19	10	8	10	0	0,39 µg/ml
100	100	100	69	52	51	13	12	9	9	0	0 µg/ml
AMB Konc.	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml

**37. Melléklet.** Az amfotericin B/fluvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											FLUV Konc.
100	100	100	A 96±1,2%	A 89±4,7%	A 54±4,7%	A 40±2,4%	43	43	42	21	25 µg/ml
100	100	100	A 89±3,0%	A 82±2,4%	A 56±3,2%	38	36	38	37	23	12,5 µg/ml
100	100	100	A 75±5,1%	A 65±4,5%	A 55±1,6%	30	22	22	24	12	6,25 µg/ml
100	100	100	69	55	A 54±0,4%	30	23	20	8	4	3,125 µg/ml
100	100	100	65	51	51	27	20	23	10	2	1,56 µg/ml
100	100	100	69	52	51	33	19	23	10	0	0,78 µg/ml
100	100	100	66	51	49	26	19	20	15	0	0,39 µg/ml
100	100	100	66	51	49	29	19	19	8	0	0 µg/ml
AMB Konc.	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml

**38. Melléklet.** Az amfotericin B /atorvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											ATOR Konc.
100	100	100	A 88±1,6%	A 54±0,7%	52	A 52±0,9%	A 52±0,5%	33	35	1	25 µg/ml
100	100	100	Sz 100	Sz 100	52	41	35	38	39	0	12,5 µg/ml
100	100	100	Sz 100	Sz 100	50	40	32	29	33	1	6,25 µg/ml
100	100	100	Sz 100	Sz 100	50	41	27	23	30	0	3,125 µg/ml
100	100	100	Sz 100	Sz 100	51	38	32	24	32	0	1,56 µg/ml
100	100	100	Sz 100	Sz 100	50	34	24	33	33	0	0,78 µg/ml
100	100	100	Sz 100	Sz 96±0,9%	51	27	26	33	35	0	0,39 µg/ml
100	100	100	63	59	51	19	15	12	10	0	0 µg/ml
AMB Konc.	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml

**39. Melléklet.** Az amfotericin B /roszuvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											ROSU Konc.
100	100	100	A 73±1,1%	A 50±2,9%	38	33	26	25	12	2	25 µg/ml
100	100	100	Sz 100±	A 61±4,5%	43	30	20	23	10	2	12,5 µg/ml
100	100	100	Sz 100±	A 65±5,0%	47	32	20	21	12	1	6,25 µg/ml
100	100	100	Sz 100±	A 62±5,4%	47	30	21	21	12	2	3,125 µg/ml
100	100	100	Sz 100±	A 64±4,1%	48	35	23	21	13	0	1,56 µg/ml
100	100	100	Sz 100±	A 63±4,6%	48	45	25	25	13	1	0,78 µg/ml
100	100	100	Sz 94±1,5%	A 61±3,9%	48	45	32	23	11	0	0,39 µg/ml
100	100	100	62	50	39	40	21	17	10	0	0 µg/ml
AMB Konc.	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml

**40. Melléklet.** A flukonazol/lovasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											LOVA. Konc.
A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 89±1,5%	A 78±1,2%	A 61±2,3%	A 58±30,%	46	19	25 µg/ml
A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	A 83±3,1%	A 63±1,1%	A 52±2,4%	46	44	19	12,5 µg/ml
A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	A 80±3,4%	A 58±0,2%	50	43	39	20	6,25 µg/ml
A 91±1,5%	Sz 97±0,7%	Sz 97±0,5%	Sz 95±0,2%	Sz 90±1,0%	A 73±2,8%	A 54±0,7%	45	40	35	14	3,125 µg/ml
A 91±0,5%	Sz 93±0,6%	Sz 96±0,6%	Sz 95±0,9%	Sz 87±1,5%	A 61±2,3%	49	43	34	28	12	1,56 µg/ml
A 85±1,2%	Sz 82±1,1%	Sz 88±0,4%	Sz 88±0,9%	Sz 81±0,5%	A 57±1,9%	45	35	30	25	1	0,78 µg/ml
A 72±1,7%	A 68±1,1%	A 74±0,4%	A 74±0,9%	A 67±1,3%	43	46	34	30	23	1	0,39 µg/ml
67	49	48	49	48	44	39	30	21	18	0	0 µg/ml
FLUK Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml

**41. Melléklet.** A flukonazol/szimvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											SZIM Konc.
A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 94±0,4%	A 54±2,4%	41	36	32	25 µg/ml
A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 92±0,4%	Sz 92±0,4%	38	29	23	25	12,5 µg/ml
A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 94±0,9%	Sz 85±0,2%	Sz 73±0,6%	19	19	19	12	6,25 µg/ml
Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 90±0,4%	Sz 76±0,4%	Sz 62±2,4%	17	17	16	6	3,125 µg/ml
Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 88±0,7%	Sz 65±4,7%	44	18	16	19	0	1,56 µg/ml
Sz 95±0,2%	Sz 93±0,2%	Sz 98±0,4%	Sz 89±0,5%	Sz 84±5,8%	45	40	20	17	20	0	0,78 µg/ml
A 81±0,4%	Sz 82±0,9%	Sz 84±0,7%	Sz 79±0,5%	Sz 53±4,1%	40	34	19	17	16	0	0,39 µg/ml
62	48	48	46	46	31	23	19	16	15	0	0 µg/ml
FLUK Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml

**42. Melléklet.** A flukonazol/fluvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											FLUV Konc.
A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 92±1,5%	Sz 91±0,2%	Sz 91±0,9%	Sz 92±1,5%	Sz 91±1,7%	Sz 92±1,5%	39	31	25 µg/ml
A 100	Sz 95±1,7%	Sz 83±5,4%	Sz 76±1,1%	Sz 68±5,2%	Sz 68±2,6%	Sz 66±0,2%	Sz 69±0,7%	Sz 61±5,5%	27	21	12,5 µg/ml
A 100	Sz 87±5,0%	A 73±5,6%	A 65±4,1%	A 56±4,9%	A 55±0,9%	A 51±2,1%	A 54±0,7%	45	19	18	6,25 µg/ml
A 92±5,3%	Sz 73±4,9%	A 58±2,8%	48	38	45	42	40	39	17	5	3,125 µg/ml
A 85±0,9%	A 61±6,8%	A 50±2,4%	39	31	28	26	26	22	13	2	1,56 µg/ml
A 75±1,3%	A 52±2,6%	44	30	31	29	25	23	20	10	1	0,78 µg/ml
A 71±1,1%	48	40	33	35	31	32	28	23	10	1	0,39 µg/ml
61	40	40	38	39	32	21	22	21	11	0	0 µg/ml
FLUK Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml

**43. Melléklet.** A flukonazol/atorvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											ATOR Konc.
Sz 100	Sz 100	Sz 92±0,3%	Sz 89±0,7%	Sz 86±0,9%	Sz 84±1,9%	Sz 81±1,3%	A 56±0,2%	A 53±1,9%	43	7	25 µg/ml
Sz 100	Sz 92±0,1%	Sz 88±1,9%	Sz 90±0,8%	Sz 87±0,4%	Sz 84±1,3%	Sz 64±3,2%	47	48	38	0	12,5 µg/ml
Sz 100	Sz 92±0,6%	Sz 86±1,5%	Sz 88±0,2%	Sz 87±1,1%	Sz 86±2,7%	48	47	37	27	4	6,25 µg/ml
Sz 100	Sz 90±0,9%	Sz 85±1,7%	Sz 86±0,4%	Sz 87±1,1%	Sz 83±0,9%	45	32	31	24	4	3,125 µg/ml
Sz 100	Sz 90±2,5%	Sz 85±2,3%	Sz 86±0,4%	Sz 86±0,6%	Sz 86±0,8%	47	39	32	25	0	1,56 µg/ml
Sz 91±1,9%	A 77±4,2%	Sz 78±2,3%	Sz 77±3,8%	Sz 76±2,3%	Sz 83±4,7%	42	31	30	26	3	0,78 µg/ml
A 79±5,7%	A 66±1,3%	A 62±1,1%	A 54±5,9%	Sz 77±6,7%	Sz 68±6,9%	43	37	37	24	0	0,39 µg/ml
57	49	48	45	41	40	38	34	25	25	0	0 µg/ml
FLUK Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml

**44. Melléklet.** A flukonazol/roszuvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											ROSU Konc.
Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 81±0,9%	Sz 68±5,5%	45	3	25 µg/ml
Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 97±2,6%	Sz 97±1,8%	A 63±0,7%	A 60±5,8%	36	1	12,5 µg/ml
Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 94±3,0%	Sz 94±1,8%	Sz 94±0,4%	A 59±5,1%	A 51±3,7%	39	1	6,25 µg/ml
Sz 100	Sz 95±0,4%	Sz 90±2,2%	Sz 87±1,5%	Sz 76±4,6%	Sz 82±5,3%	Sz 78±0,3%	A 55±2,1%	47	38	0	3,125 µg/ml
Sz 92±1,3%	Sz 91±0,6%	Sz 76±5,2%	Sz 73±2,8%	A 61±1,6%	Sz 73±5,3%	Sz 74±0,7%	A 56±3,3%	46	40	0	1,56 µg/ml
A 77±1,0%	A 63±3,3%	A 57±4,2%	A 64±1,2%	A 51±1,2%	A 51±3,5%	A 59±0,4%	A 55±0,9%	49	43	0	0,78 µg/ml
54	52	50	48	47	49	46	47	45	35	0	0,39 µg/ml
51	49	46	47	45	45	45	45	43	43	0	0 µg/ml
FLUK Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml

**45. Melléklet.** A flukonazol/pravasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											PRAV Konc.
A 66±1,5%	A 59±4,8%	A 56±4,7%	Sz 57±1,7%	43	34	11	15	15	4	2	25 µg/ml
A 63±3,0%	A 57±1,9%	A 53±4,9%	49	36	31	18	15	10	5	2	12,5 µg/ml
A 53±2,4%	A 60±1,5%	A 51±2,6%	50	42	45	19	17	12	2	1	6,25 µg/ml
A 62±3,8%	A 57±2,1%	A 51±4,5%	46	33	32	18	11	14	8	1	3,125 µg/ml
A 57±2,6%	A 57±2,8%	A 52±2,8%	47	45	31	11	8	11	8	2	1,56 µg/ml
A 59±3,6%	A 58±5,4%	A 53±0,8%	49	43	26	19	16	10	2	0	0,78 µg/ml
52	50	45	44	42	31	15	9	11	7	0	0,39 µg/ml
52	39	39	35	37	30	13	11	4	1	0	0 µg/ml
FLUK Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml

**46. Melléklet.** Az itraconazol/lovasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											LOVA Konc.
100	100	100	A 100	A 100	A 100	A 100	A 97±0,3%	A 88±1,4%	A 68±3,1%	10	25 µg/ml
100	100	100	A 100	A 100	A 100	A 100	A 93±4,7%	A 72±3,3%	A 66±1,9%	8	12,5 µg/ml
100	100	100	A 100	A 100	A 100	A 100	A 80±2,4%	A 71±0,9%	A 61±0,5%	8	6,25 µg/ml
100	100	100	A 100	A 100	A 100	A 93±0,3%	75	A 69±0,9%	A 59±1,1%	8	3,125 µg/ml
100	100	100	A 100	A 100	A 98±0,2%	76	72	A 67±2,0%	52	7	1,56 µg/ml
100	100	100	A 98±0,9%	A 98±0,3%	A 95±0,3%	77	72	62	49	6	0,78 µg/ml
100	100	100	96	93	A 91±0,3%	73	70	57	44	2	0,39 µg/ml
100	100	100	92	90	83	70	71	53	42	2	0 µg/ml
ITRA Konc.	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml

**47. Melléklet.** Az itraconazol/szimvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											SZIM Konc.
100	100	100	A 100	A 100	A 100	A 100	A 100	A 100	Sz 100	41	25 µg/ml
100	100	100	A 100	A 100	A 100	A 100	A 100	A 100	Sz 100	32	12,5 µg/ml
100	100	100	A 100	A 100	A 100	A 100	A 100	A 100	Sz 74±0,2%	17	6,25 µg/ml
100	100	100	A 100	A 100	A 95±0,4%	A 91±1,9%	A 91±1,5%	A 79±0,5%	Sz 71±0,5%	10	3,125 µg/ml
100	100	100	94	96	91	A 88±2,4%	A 70±1,1%	A 84±0,7%	Sz 56±0,7%	0	1,56 µg/ml
100	100	100	94	93	91	71	70	59	50	0	0,78 µg/ml
100	100	100	94	93	91	70	64	59	44	0	0,39 µg/ml
100	100	100	95	93	87	67	63	57	33	0	0 µg/ml
ITRA Konc.	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml



**48. Melléklet.** Az itraconazol/fluvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											FLUV Konc.
100	100	100	A 100	A 100	A 100	A 100	A 100	A 100	Sz 97±0,3%	22	25 µg/ml
100	100	100	A 100	A 100	A 100	A 100	A 100	A 100	Sz 94±0,7%	18	12,5 µg/ml
100	100	100	A 100	A 100	A 100	A 100	A 100	A 98±1,2%	Sz 91±1,2%	17	6,25 µg/ml
100	100	100	A 100	A 100	A 100	A 100	A 98±0,9%	A 94±1,9%	A 82±3,3%	15	3,125 µg/ml
100	100	100	93	93	A 97±0,3%	A 98±0,6%	A 95±1,2%	A 93±1,6%	Sz 79±4,5%	2	1,56 µg/ml
100	100	100	93	93	A 97±0,3%	A 98±0,3%	A 95±2,4%	A 89±0,4%	Sz 72±4,9%	2	0,78 µg/ml
100	100	100	94	93	A 97±0,6%	A 98±0,4%	A 94±1,0%	A 82±4,3%	Sz 73±5,2%	0	0,39 µg/ml
100	100	100	93	93	87	89	82	67	47	0	0 µg/ml
ITRA Konc.	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml

**49. Melléklet.** Az itraconazol/atorvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											ATOR Konc.
100	100	100	A 100	A 100	A 100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 97±0,2%	1	25 µg/ml
100	100	100	A 100	A 100	A 100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 97±0,7%	1	12,5 µg/ml
100	100	100	A 100	A 100	A 100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 95±1,3%	0	6,25 µg/ml
100	100	100	A 100	A 100	A 100	A 97±1,0%	Sz 97±1,5%	Sz 97±0,2%	Sz 97±0,8%	1	3,125 µg/ml
100	100	100	A 100	96	A 97±0,2%	A 98±0,3%	Sz 98±1,1%	Sz 95±0,9%	Sz 85±1,8%	-1	1,56 µg/ml
100	100	100	97	96	A 97±0,2%	A 92±3,5%	Sz 91±2,2%	Sz 92±5,0%	Sz 84±2,3%	-1	0,78 µg/ml
100	100	100	96	96	A 95±1,5%	A 87±4,1%	A 86±2,8%	Sz 86±5,3%	Sz 77±5,8%	0	0,39 µg/ml
100	100	100	96	96	71	68	60	55	44	0	0 µg/ml
ITRA Konc.	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml

**50. Melléklet.** Az itraconazol/roszuvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											ROSU Konc.
100	100	100	A 100	A 100	A 100	A 93±0,4%	66	61	37	0	25 µg/ml
100	100	100	A 100	A 100	A 100	78	65	60	36	0	12,5 µg/ml
100	100	100	A 100	A 100	A 100	77	65	59	32	0	6,25 µg/ml
100	100	100	96	93	A 94±0,7%	77	65	60	32	0	3,125 µg/ml
100	100	100	96	92	A 88±1,2%	74	66	60	31	0	1,56 µg/ml
100	100	100	96	92	A 89±2,0%	74	66	61	32	0	0,78 µg/ml
100	100	100	96	93	A 85±3,7%	74	66	61	32	0	0,39 µg/ml
100	100	100	95	92	74	73	66	61	31	0	0 µg/ml
ITRA Konc.	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml

**51. Melléklet.** Az itraconazol/pravasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											PRAV Konc.
100	100	100	96	96	81	79	70	53	A 53±0,9%	2	25 µg/ml
100	100	100	96	96	73	75	65	60	A 52±0,4%	2	12,5 µg/ml
100	100	100	95	95	74	76	68	61	A 51±0,4%	1	6,25 µg/ml
100	100	100	95	95	73	77	70	57	A 50±0,9%	2	3,125 µg/ml
100	100	100	95	95	80	76	63	56	A 51±0,7%	1	1,56 µg/ml
100	100	100	95	95	76	74	68	64	A 51±0,3%	2	0,78 µg/ml
100	100	100	95	94	66	73	69	52	45	0	0,39 µg/ml
100	100	100	94	94	70	71	65	52	42	0	0 µg/ml
ITRA Konc.	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml

**52. Melléklet.** A grizeofulvin/fluvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											FLUV Konc.
Sz 71±0,9%	Sz 67±1,3%	Sz 64±1,6%	A 57±2,5%	A 55±2,5%	A 55±1,2%	A 48±1,2%	A 46±2,7%	A 42±2,3%	A 43±0,9%	30	25 µg/ml
A 39±3,5%	A 34±3,1%	A 35±3,7%	A 35±2,5%	A 37±3,5%	A 36±3,0%	A 35±3,3%	A 34±3,1%	A 31±2,7%	A 31±2,2%	29	12,5 µg/ml
A 24±3,7%	A 25±4,7%	A 22±4,4%	A 22±2,7%	A 21±3,1%	A 23±3,7%	A 20±2,7%	A 21±2,6%	A 22±2,9%	A 22±4,0%	18	6,25 µg/ml
16	17	16	17	14	17	14	15	16	14	8	3,125 µg/ml
12	15	15	11	9	16	14	16	15	11	0	1,56 µg/ml
15	14	15	12	14	14	13	18	11	7	0	0,78 µg/ml
13	14	12	9	10	15	11	11	11	8	0	0,39 µg/ml
13	11	12	11	13	13	12	12	10	8	0	0 µg/ml
GRIS Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml

**53. Melléklet.** A ketokonazol/lovasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											LOVA Konc.
100	100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	A 81±4,6%	14	25 µg/ml
100	100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	A 97±0,3%	Sz 96±0,6%	A 70±4,1%	14	12,5 µg/ml
100	100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 96±0,7%	A 87±4,2%	A 85±4,1%	A 74±3,3%	A 63±1,3%	8	6,25 µg/ml
100	100	A 100	Sz 97±1,4%	A 93±1,7%	A 80±3,4%	A 72±3,5%	A 71±0,6%	A 62±0,5%	A 58±0,8%	7	3,125 µg/ml
100	100	A 100	A 86±3,7%	A 75±2,0%	66	65	64	A 67±0,9%	A 61±1,2%	8	1,56 µg/ml
100	100	A 93±0,6%	A 70±3,7%	65	64	63	67	A 69±0,6%	A 59±0,9%	4	0,78 µg/ml
100	100	A 90±1,4%	61	63	63	68	69	A 68±0,3%	A 54±1%	0	0,39 µg/ml
100	100	75	57	62	60	62	60	49	48	0	0 µg/ml
KETO Konc.	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml

**54. Melléklet.** A ketokonazol/szimvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											SZIM Konc.
100	100	A 100	A 100	A 100	A 100	A 100	A 100	A 100	Sz 100	47	25 µg/ml
100	100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	35	12,5 µg/ml
100	100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 90±0,9%	25	6,25 µg/ml
100	100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 81±2,9%	14	3,125 µg/ml
100	100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 95±2,6%	Sz 92±3,1%	Sz 89±1,8%	Sz 66±5,1%	3	1,56 µg/ml
100	100	A 100	Sz 100	Sz 81±3,3%	Sz 83±4,0%	Sz 90±1,3%	Sz 87±0,7%	Sz 82±2,4%	A 58±2,9%	8	0,78 µg/ml
100	100	84	82	62	68	Sz 83±2,4%	Sz 81±3,5%	Sz 73±4,8%	44	2	0,39 µg/ml
100	100	69	66	57	57	54	55	41	34	2	0 µg/ml
KETO Konc.	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml

**55. Melléklet.** A ketokonazol/fluvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											FLUV Konc.
100	100	A 100	A 100	A 100	SZ 100	A 100	A 100	Sz 100	Sz 100	27	25 µg/ml
100	100	A 100	A 100	A 100	SZ 100	A 100	A 100	Sz 100	Sz 100	26	12,5 µg/ml
100	100	A 100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	20	6,25 µg/ml
100	100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	10	3,125 µg/ml
100	100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 97±2,2%	2	1,56 µg/ml
100	100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 91±1,9%	2	0,78 µg/ml
100	100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 96±2,4	Sz 85±4,0%	1	0,39 µg/ml
100	100	59	60	56	51	58	56	42	40	0	0 µg/ml
KETO Konc.	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml

**56. Melléklet.** A ketokonazol/atorvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											ATOR Konc.
100	100	A 100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	1	25 µg/ml
100	100	A 100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	1	12,5 µg/ml
100	100	A 100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	0	6,25 µg/ml
100	100	A 100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 91±0,9%	0	3,125 µg/ml
100	100	A 100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 92±1,2%	Sz 89±0,9%	0	1,56 µg/ml
100	100	A 100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 89±4,1%	Sz 90±1,7%	Sz 88±1,7%	0	0,78 µg/ml
100	100	A 100	A 100	Sz 100	Sz 96±3,4%	Sz 97±1,2%	Sz 88±1,7%	Sz 87±0,6%	Sz 79±5,2%	0	0,39 µg/ml
100	100	72	71	65	63	58	58	47	41	0	0 µg/ml
KETO Konc.	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml

**57. Melléklet.** A ketokonazol/roszuvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											ROSU Konc.
100	100	A 100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	0	25 µg/ml
100	100	A 100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	0	12,5 µg/ml
100	100	A 100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	0	6,25 µg/ml
100	100	A 100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	0	3,125 µg/ml
100	100	A 100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 98±1,1%	0	1,56 µg/ml
100	100	A 100	A 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 70±5,9%	Sz 68±0,9%	0	0,78 µg/ml
100	100	A 82±1,8%	A 82±0,9%	A 80±0,9%	A 71±4,4%	A 73±2,5%	A 70±2,8%	A 60±1,3%	A 58±1,8%	0	0,39 µg/ml
100	100	68	70	65	60	58	58	48	44	0	0 µg/ml
KETO Konc.	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml

**58. Melléklet.** A ketokonazol/pravasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											PRAV Konc.
100	100	Sz 100	Sz 97±0,4%	86	75	59	61	46	42	1	25 µg/ml
100	100	Sz 98±0,7%	65	75	57	55	53	43	44	2	12,5 µg/ml
100	100	75	72	72	52	51	54	44	43	1	6,25 µg/ml
100	100	62	76	77	51	52	53	44	44	2	3,125 µg/ml
100	100	53	66	68	52	55	53	46	42	1	1,56 µg/ml
100	100	57	61	65	56	58	58	46	43	3	0,78 µg/ml
100	100	56	63	62	56	58	59	46	43	2	0,39 µg/ml
100	100	54	62	60	58	53	55	48	44	2	0 µg/ml
KETO Konc.	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml

**59. Melléklet.** A nystatin/szimvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											SZIM Konc.
100	100	100	100	A 86±3,2%	A 53±1,8%	A 52±1,2%	A 54±0,9%	A 54±2,6%	A 55±3,2%	47	25 µg/ml
100	100	100	100	55	A 37±4,1%	A 46±5,8%	A 32±2,1%	A 40±3,1%	A 33±4,5%	37	12,5 µg/ml
100	100	100	100	54	23	23	22	24	20	17	6,25 µg/ml
100	100	100	100	52	23	22	21	21	16	0	3,125 µg/ml
100	100	100	100	57	22	22	22	19	17	0	1,56 µg/ml
100	100	100	100	55	23	20	21	18	16	0	0,78 µg/ml
100	100	100	100	57	23	21	19	18	15	2	0,39 µg/ml
100	100	100	100	55	21	20	19	17	15	0	0 µg/ml
NYS Konc.	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml

**60. Melléklet.** A nystatin/fluvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											FLUV Konc.
100	100	100	100	A 100	Sz 100	Sz 92±3,0%	Sz 78±2,2%	Sz 78±2,2%	Sz 70±2,2%	35	25 µg/ml
100	100	100	100	Sz 100	Sz 100	Sz 66±2,1%	Sz 60±1,5%	Sz 60±1,5%	Sz 47±0,9%	27	12,5 µg/ml
100	100	100	100	Sz 100	Sz 100	Sz 51±3,2%	A 38±4,6%	A 38±3,9%	Sz 41±1,5%	19	6,25 µg/ml
100	100	100	100	Sz 100	Sz 98±0,4%	Sz 37±1,3%	A 26±3,6%	A 26±4,6%	Sz 30±3,0%	11	3,125 µg/ml
100	100	100	100	Sz 100	Sz 89±5,1%	Sz 33±5,4%	A 23±1,5%	A 23±1,5%	Sz 25±2,7%	2	1,56 µg/ml
100	100	100	100	Sz 100	36	23	A 21±2,6%	A 21±2,6%	Sz 22±4,2%	3	0,78 µg/ml
100	100	100	100	Sz 100	38	11	20	20	5	2	0,39 µg/ml
100	100	100	100	51	31	15	11	11	1	2	0 µg/ml
NYS Konc..	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0 µg/ml

**61. Melléklet.** A terbinafin/szimvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											SZIM Konc.
100	86	56	A 56±3,3%	47	46	43	47	48	48	45	25 µg/ml
100	84	54	35	32	31	36	35	36	36	38	12,5 µg/ml
100	81	59	27	24	25	24	24	27	25	24	6,25 µg/ml
100	77	56	30	24	23	22	23	24	23	9	3,125 µg/ml
100	78	57	25	22	21	17	19	19	9	0	1,56 µg/ml
100	79	57	28	23	27	16	16	13	8	0	0,78 µg/ml
100	79	56	25	22	27	18	16	8	8	0	0,39 µg/ml
100	79	57	23	20	19	11	11	5	5	0	0 µg/ml
TER Konc.	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml

**62. Melléklet.** A terbinafin/fluvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											FLUV Konc.
100	A 100	A 93±1,1%	A 87±0,2%	A 83±0,4%	A 84±0,5%	A 76±0,8%	Sz 79±0,6%	Sz 76±0,7%	Sz 76±0,3%	33	25 µg/ml
100	A 96±0,5%	A 83±0,3%	A 74±0,5%	A 71±0,8%	A 69±0,8%	A 68±0,3%	A 61±1,5%	A 66±1,7%	A 66±1,2%	34	12,5 µg/ml
100	A 96±0,3%	A 76±0,2%	A 71±0,2%	A 64±0,6%	A 51±0,2%	A 65±0,2%	A 66±0,3%	A 60±0,3%	A 60±1,5%	29	6,25 µg/ml
100	A 95±0,2%	A 64±0,3%	A 52±0,3%	49	46	48	41	45	45	6	3,125 µg/ml
100	A 93±0,3%	A 67±0,3%	40	44	38	37	47	37	37	1	1,56 µg/ml
100	A 91±0,8%	A 67±0,8%	42	39	35	32	46	38	38	2	0,78 µg/ml
100	86	A 64±2,5%	35	21	29	39	37	38	38	2	0,39 µg/ml
100	87	44	42	38	37	30	23	22	22	0	0 µg/ml
TER Konc.	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml

**63. Melléklet.** A terbinafin/roszuvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											ROSU Konc.
100	A 100	A 62±0,4%	Sz 57±2,1%	38	35	28	29	22	20	1	25 µg/ml
100	74	48	43	24	36	23	26	17	20	1	12,5 µg/ml
100	72	48	43	33	28	24	15	12	8	0	6,25 µg/ml
100	76	48	44	32	24	22	14	10	9	2	3,125 µg/ml
100	75	45	48	34	24	22	12	11	7	0	1,56 µg/ml
100	74	46	41	37	24	22	14	10	9	0	0,78 µg/ml
100	75	48	36	32	24	21	11	11	7	0	0,39 µg/ml
100	73	48	27	18	17	11	6	4	4	0	0 µg/ml
TER Konc.	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml	0,03 µg/ml	0,015 µg/ml	0 µg/ml



**64. Melléklet.** A primycin/szimvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											SZIM Konc.
100	100	100	A 100	Sz 91±0,7%	Sz 51±0,5%	32	31	30	31	30	25 µg/ml
100	100	100	Sz 98±0,2	Sz 53±1,5%	Sz 34±1,6%	20	18	17	14	15	12,5 µg/ml
100	100	100	A 85±1,0%	Sz 36±1,1%	Sz 21±0,5%	11	11	11	13	12	6,25 µg/ml
100	100	100	A 61±0,8%	Sz 23±0,2%	16	9	6	9	7	7	3,125 µg/ml
100	100	100	A 57±0,7%	Sz 23±0,5%	15	5	6	6	5	4	1,56 µg/ml
100	100	100	A 59±0,5%	18	5	4	4	3	3	1	0,78 µg/ml
100	100	100	A 57±1,0%	3	3	2	3	3	2	0	0,39 µg/ml
100	100	100	26	0	0	0	2	2	0	0	0 µg/ml
PRI Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml

**65. Melléklet.** A primycin/fluvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

FLUV Konc.											
100	100	100	Sz 100	Sz 100	Sz 100	Sz 93±0,3%	Sz 74±1,9%	Sz 72±2,5%	Sz 66±1,7%	32	25 µg/ml
100	100	100	Sz 100	Sz 70±0,6%	33	26	29	30	31	30	12,5 µg/ml
100	100	100	Sz 100	Sz 51±1,4%	27	26	29	28	26	23	6,25 µg/ml
100	100	100	Sz 82±3,9%	Sz 32±2,3%	20	18	21	16	20	14	3,125 µg/ml
100	100	100	Sz 75±3,1%	Sz 23±2,5%	15	13	12	10	12	9	1,56 µg/ml
100	100	100	Sz 70±1,2%	Sz 21±5,2%	12	9	12	10	11	6	0,78 µg/ml
100	100	100	Sz 51±6,0%	12	4	4	8	3	5	0	0,39 µg/ml
100	100	100	28	3	2	2	2	3	0	0	0 µg/ml
PRI Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml

**66. Melléklet.** A primycin/roszuvasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

											ROSU Konc.	
PRI Konc.	100	100	100	Sz 86±2,8%	Sz 22±5,3%	13	14	15	17	17	7	25 µg/ml
	100	100	100	Sz 44±3,4%	15	11	14	13	15	11	1	12,5 µg/ml
	100	100	100	Sz 38±2,5%	9	7	8	8	11	9	1	6,25 µg/ml
	100	100	100	Sz 35±3,5%	3	1	0	1	4	4	1	3,125 µg/ml
	100	100	100	Sz 23±1,8%	0	0	0	0	2	0	1	1,56 µg/ml
	100	100	100	20	0	0	0	0	0	0	0	0,78 µg/ml
	100	100	100	20	0	0	0	2	1	1	0	0,39 µg/ml
	100	100	100	20	0	0	0	0	0	0	0	0 µg/ml
	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml	

**67. Melléklet.** A primycin/pravasztatin kombináció során mért gátlási százalékok átlaga *C. tropicalis* esetében

PRAV Konc.											
100	100	100	Sz 94±1,8	26	18	5	0	0	0	0	25 µg/ml
100	100	100	Sz 53±1,3	17	14	0	0	0	1	0	12,5 µg/ml
100	100	100	A 47±1,1	12	11	0	0	0	0	0	6,25 µg/ml
100	100	100	A 45±0,7	12	10	0	0	0	0	0	3,125 µg/ml
100	100	100	41	12	14	0	0	0	0	0	1,56 µg/ml
100	100	100	38	13	10	0	0	0	0	0	0,78 µg/ml
100	100	100	36	12	12	0	0	0	2	0	0,39 µg/ml
100	100	100	34	17	11	0	0	0	0	0	0 µg/ml
PRI Konc.	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0 µg/ml