



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**In vivo μελέτη διασταυρούμενης αντοχής της *Candida parapsilosis*
στις εχινοκανδίνες σε μοντέλο ποντικών με διάχυτη καντιντίαση**

Δήμητρα Δημοπούλου
Ιατρός

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΛΟΙΜΩΞΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
Επιβλέπων Καθηγητής: Γεώργιος Σαμώνης

Ηράκλειο, Οκτώβριος 2015

Στους γονείς μου, Άγγελο και Γεωργία
Στις αδερφές μου, Νατάσα και Κωνσταντίνα

Περιεχόμενα

Χαρακτηριστικά διδακτορικής διατριβής	9
Βιογραφικό σημείωμα	11
Πρόλογος-Ευχαριστίες	21
Περίληψη διδακτορικής διατριβής	25
Περίληψη διδακτορικής διατριβής στην Αγγλική	29
Γενικό μέρος	33
A. Διηθητική Καντιντίαση	35
-Γενικά	35
-Παράγοντες κινδύνου	36
-Διάγνωση	39
-Θεραπεία	40
-Πρόληψη-Προφύλαξη	43
B. <i>Candida parapsilosis</i>: Ένας αναδύμενος μύκητας	45
-Γενικά	45
-Επίπτωση	48
-Παράγοντες κινδύνου	49
-Κλινικές εκδηλώσεις	51
-Mυκηταιμία	51
-Ενδοκαρδίτιδα	54
-Μηνιγγίτιδα	55
-Περιτονίτιδα	55
-Αρθρίτιδα	56
-Οφθαλμικές λοιμώξεις	56
-Ωτομύκωση	57
-Ονυχομυκητίαση	57
-Αιδοιοκολπίτιδα	58
-Λοίμωξη ουροποιητικού	58

-Παθογένεια	59
-Προσκόλληση	59
-Σχηματισμός biofilms	59
-Έκκριση ενζύμων	61
-Ευαισθησία στα αντιμυκητικά φάρμακα	62
-Συμπέρασμα	65
Γ.Εχινοκανδίνες: τα νεότερα αντιμυκητικά φάρμακα	67
-Γενικά	67
-Σύμπλεγμα συνθετάσης της γλυκόνης	70
- Ο ρόλος της βιοσύνθεσης και της ακεραιότητας του κυτταρικού τοιχώματος στην αποτελεσματικότητα του φαρμάκου	71
- Αναδιαμόρφωση του κυτταρικού τοιχώματος και η επίπτωση της θεραπείας με εχινοκανδίνες στην ανοσολογική απάντηση.....	73
-Αλληλεπιδράσεις ξενιστή-παθογόνου και ανοσολογική ανοχή.....	74
- Μηχανισμοί αντοχής της <i>Candida</i> στις εχινοκανδίνες	76
- Παράδοξο φαινόμενο: Θεωρείται αντοχή στον αντιμυκητικό παράγοντα?	79
- Κριτήρια για κλινική αντοχή στις εχινοκανδίνες	80
Σκοπός της μελέτης	81
Ειδικό μέρος	87
A. Υλικά και Μέθοδοι	89
- Δοκιμασία Ευαισθησίας	89
-Στελέχη <i>Candida parapsilosis</i>	90
-Αντιμυκητικοί παράγοντες	92
-Ποντίκια	93
- Δημιουργία μοντέλου ποντικών με διάχυτη καντιντίαση.....	94
- <i>In vivo</i> εκτίμηση της θεραπείας	95

- Μέθοδος ELISA για προσδιορισμό IL-6 και TNF-a.....	99
- Στατιστική ανάλυση	100
B. Αποτελέσματα	101
- Καθιέρωση ενός μοντέλου ποντικών διάχυτης καντιντίασης από <i>C. Parapsilosis</i>	101
- Το στέλεχος <i>C. parapsilosis</i> που είναι ευαίσθητο στην κασποφουγκίνη (CAS-S) είναι πιο λοιμογόνο σε σύγκριση με τα στελέχη <i>C. parapsilosis</i> που παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία στην κασποφουγκίνη στο μοντέλο ποντικών	105
- Οι εχινοκανδίνες κατέχουν σημαντική δραστηριότητα έναντι στελεχών <i>C. parapsilosis</i> που παρουσιάζουν ευαισθησία ή ενδιάμεση αντοχή στην κασποφουγκίνη (CAS-S και CAS-I στελέχη) <i>in vivo</i>	105
- Η θεραπεία είτε με την CAS είτε με την ANF είναι λιγότερο αποτελεσματική έναντι του στελέχους <i>C. Parapsilosis</i> που είναι ανθεκτικό στην CAS (CAS-R στέλεχος)	109
- Παθολογοανατομική ανάλυση του μυκητικού φορτίου των ιστών των οργάνων των ποντικών με διάχυτη καντιντίαση	110
- Προσδιορισμός της ποσότητας των κυτταροκινών (IL-6 και TNFα) στα υπερκείμενα του ήπατος και του νεφρού σε ποντίκια που μολύνθηκαν με τα 3 στελέχη <i>C. parapsilosis</i> και θεραπεύτηκαν με εχινοκανδίνες ή DMSO.....	113
Γ. Συζήτηση	115
- Συμπέρασμα	125
Βιβλιογραφικές αναφορές	127
Παράρτημα	155

Διδακτορική Διατριβή Ιατρού Δήμητρας Δημοπούλου

Τίτλος: *In vivo* μελέτη διασταυρούμενης αντοχής της *Candida parapsilosis* στις εχινοκανδίνες σε μοντέλο ποντικών με διάχυτη καντιντίαση

Ημερομηνία έναρξης: 15 Ιουνίου 2011

Ημερομηνία υποβολής αίτησης σχηματισμού επταμελούς επιτροπής: 15 Ιουνίου 2015

Επιβλέπων Καθηγητής: Γεώργιος Σαμώνης, Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας

Τριμελής Επιτροπή:

Γεώργιος Σαμώνης, Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας

Ελένη Παπαδάκη, Καθηγήτρια Κλινικής Αιματολογίας

Εμμανουήλ Γαλανάκης, Αν. Καθηγητής Παιδιατρικής

Επταμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Γεώργιος Σαμώνης, Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας

Ελένη Παπαδάκη, Καθηγήτρια Κλινικής Αιματολογίας

Εμμανουήλ Γαλανάκης, Αν. Καθηγητής Παιδιατρικής, Λοιμωξιολόγος

Διαμαντής Κοφτερίδης, Επ. Καθηγητής Παθολογίας, Λοιμωξιολόγος

Ιωάννης Γερμανάκης, Επ. Καθηγητής Παιδιατρικής-Παιδιατρικής Καρδιολογίας

Δημήτριος Μαυρουδής, Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας

Δημήτριος Γεωργόπουλος, Καθηγητής Εντατικής Ιατρικής

**ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ
ΔΗΜΗΤΡΑΣ ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΥ**

I. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ - ΣΠΟΥΔΕΣ – ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑ

1. Προσωπικά στοιχεία

Όνοματεπώνυμο: Δήμητρα Δημοπούλου του Άγγελου
Ημερομηνία γέννησης: 30 Ιανουαρίου 1986
Τόπος γέννησης: Χολαργός Αττικής
Υπηκοότητα: Ελληνική
Διεύθυνση κατοικίας: Πεστών 9, Αθήνα
Τηλέφωνο επικοινωνίας: 6972216760
e-mail: dimi_med@hotmail.com
Άδεια ασκήσεως επαγγέλματος: Νομαρχία Ηρακλείου, αριθμ. 2125/09-03-2010

2. Παρούσα θέση: **Ειδικευόμενη ιατρός** της Γ' Πανεπιστημιακής Παιδιατρικής Κλινικής του ΠΓΝ Αττικών.

3. Εκπαίδευση-Μετεκπαίδευση

Διπλώματα **Πτυχίο Ιατρικής** Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης (Ηράκλειο) με βαθμό “Λίαν καλώς”, 20/7/2009.
Απολυτήριο Λυκείου (1^ο Λύκειο Καρδίτσας, 2003)

Γλώσσες: Ελληνική (μητρική γλώσσα), Αγγλική, Γαλλική.
Η/Υ: Άριστη γνώση και χρήση Ηλεκτρονικών Υπολογιστών (φροντιστήριο εκμάθησης Η/Υ, 1997-2000)

Μεταπτυχιακή εκπαίδευση- θέσεις:

2009-2013 **Επιστημονικός συνεργάτης** της Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου.

2011 **Έναρξη διδακτορικής διατριβής** με θέμα ‘*In vivo* μελέτη διασταυρούμενης αντοχής της

Candida parapsilosis στις εχινοκανδίνες σε
μοντέλο ποντικών με διάχυτη καντιντίαση,
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης

2013-2014

Υπηρεσία Υπαίθρου (ΓΝ Καρδίτσας-ΚΥ Μουζακίου)

Από 2014

Ειδικότητα Παιδιατρικής,
«Αττικών» Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών

4. Μέλος Επιστημονικών Εταιρειών

1. Ιατρικός σύλλογος Ηρακλείου
2. ΕΕΦΙΕ (Επιστημονική Εταιρεία Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας)
3. Ελληνική Εταιρεία Ιατρικής Μυκητολογίας

II. ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΟ ΕΡΓΟ

Επιστημονικός συνεργάτης Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (2009-2013), με ευρύ φάσμα δραστηριοτήτων (συμμετοχή σε Εκπαιδευτικά Μαθήματα, Εξωτερικά Ιατρεία, Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών και κύριο επιστημονικό έργο, κλινική και εργαστηριακή έρευνα στο αντικείμενο της Λοιμωξιολογίας).

III. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

Ξενόγλωσσες δημοσιεύσεις σε indexed περιοδικά του ISI

1. Kofteridis DP, Alexopoulou C, Valachis A, Maraki S, **Dimopoulou D**, Georgopoulos D, Samonis G. Aerosolized plus Intravenous Colistin versus Intravenous Colistin Alone for the Treatment of Ventilator-Associated Pneumonia: A Matched Case-Control Study. Clin Infect Dis. 2010;5:1238-44.
2. Samonis G, Vouloumanou EK, Christofaki M, **Dimopoulou D**, Maraki S, Triantafyllou E, Kofteridis DP, Falagas ME. Serratia infections in a general hospital: characteristics and outcomes. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011 May;30(5):653-60.

3. Kofteridis DP, Valachis A, Koutsounaki E, Maraki S, Mavrogeni E, Economidou FN, **Dimopoulou D**, Kalbakis K, Georgoulas V, Samonis G. Skin and soft tissue infections in patients with solid tumours. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:804518.
4. Samonis G, Karageorgopoulos DE, Maraki S, Levis P, **Dimopoulou D**, Spornovasilis NA, Kofteridis DP, Falagas ME. *Stenotrophomonas maltophilia* infections in a general hospital: patient characteristics, antimicrobial susceptibility, and treatment outcome. *PLoS One*. 2012;7(5):e37375.
5. Samonis G, Galanakis E, Ntaoukakis M, Sarchianaki E, Spathopoulou T, **Dimopoulou D**, Kofteridis DP, Maraki S. Effects of carbapenems and their combination with amikacin on murine gut colonisation by *Candida albicans*. *Mycoses*. 2013;56(2):105-9.
6. Samonis G, Vardakas KZ, Maraki S, Tansarli GS, **Dimopoulou D**, Kofteridis DP, Andrianaki AM, Falagas ME. A prospective study of characteristics and outcomes of bacteremia in patients with solid organ or hematologic malignancies. *Support Care Cancer*. 2013;21(9):2521-6.
7. Dimopoulou A, **Dimopoulou D**, Christianakis E, Bourikas D, Alexandrou I, Samonis G. Spontaneous bacterial peritonitis caused by nontypeable *Haemophilus influenzae* in a previously healthy child. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(6):704.
8. Kofteridis DP, **Dimopoulou D**, Maraki S, Valachis A, Galanakis I, Samonis G. Delayed-onset *Mycobacterium tuberculosis* prosthetic joint infection after hip hemiarthroplasty: A case report and review of the literature. *Clin Microbiol Infect*. 2013;21(4):403-4.
9. **Dimopoulou D**, Hamilos G, Tzardi M, Lewis RE, Samonis G, Kontoyiannis DP. Anidulafungin versus Caspofungin in a Mouse Model of Candidiasis Caused by Anidulafungin-Susceptible *Candida parapsilosis* Isolates with Different Degrees of Caspofungin Susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(1):229-36.
10. Messaritakis I, Samonis G, **Dimopoulou D**, Maraki S, Papadakis JA, Daraki V, Fragaki M, Choulaki C, Andrianaki AM, Kofteridis DP. *Staphylococcus aureus* nasal carriage might be associated with vitamin D receptor polymorphisms in type 2 diabetes. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(9):920-5.
11. Kofteridis DP, Valachis A, **Dimopoulou D**, Maraki S, Christidou A, Mantadakis E, Samonis G. Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection/colonization: A case-case-control study. *J Infect Chemother*. 2014;20:293-7.
12. Samonis G, Korbila IP, Maraki S, Michailidou I, Vardakas KZ, Kofteridis D, **Dimopoulou D**, Gkogkozotou VK, Falagas ME. Trends of isolation of intrinsically resistant to colistin Enterobacteriaceae and association with

- colistin use in a tertiary hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(9):1505-10
13. Samonis G, Vardakas KZ, Kofteridis DP, **Dimopoulou D**, Andrianaki AM, Chatzinikolaou I, Katsanevaki E, Maraki S, Falagas ME. Characteristics, risk factors and outcomes of adult cancer patients with extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Infection*. 2014;42(4):721-8.
 14. Maraki S, Samonis G, **Dimopoulou D**, Mantadakis E. Susceptibility of Glycopeptide-Resistant Enterococci to Linezolid, Quinupristin/dalfopristin, Tigecycline and Daptomycin in a Tertiary Greek Hospital. *Infect Chemother*. 2014;46(4):253-6
 15. Samonis G, Vardakas KZ, Tansarli GS, **Dimopoulou D**, Papadimitriou G, Kofteridis DP, Maraki S, Karanika M, Falagas ME. *Clostridium difficile* in Crete, Greece: epidemiology, microbiology and clinical disease. *Epidemiol. Infect.* 2015; In press.
 16. Maraki S, **Dimopoulou D**, Andrianaki AM, Karageorgiadis AS, Kyvernitakis A, Lionakis S, Kofteridis DP, Samonis G. Effects of caspofungin, anidulafungin and micafungin on murine gut colonization by *Candida albicans*. *Medical Mycology* 2015; In press.

Ανακοινώσεις σε Διεθνή Συνέδρια

1. D. Kofteridis, M. Christofaki, A. Valachis, C. Mattheou, **D. Dimopoulou**, I. Aristeidou, A. Christidou, G. Samonis. Epidemiology, clinical and microbiological features of infectious endocarditis: a review of 54 cases. P 953. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Helsinki, Finland. 16-19 May, 2009.
2. D. Kofteridis, C. Mattheou, J. Papadakis, A. Valachis, M. Tzanakakis, **D. Dimopoulou**, S. Maraki, G. Samonis. Community-acquired pneumonia in elderly patients with and without type 2 diabetes mellitus. P 2082. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Helsinki, Finland. 16-19 May, 2009.
3. D. Kofteridis, A. Valachis, **D. Dimopoulou**, M. Christofaki, S. Maraki, L. Sifaki, G. Samonis. Factors influencing the length of hospitalization of elderly patients with cellulitis. P 1365. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Vienna, Austria. 10-13 April, 2010.
4. D. Kofteridis, A. Valachis, C. Alexopoulou, S. Maraki, **D. Dimopoulou**, F. Economidou, E. Mavrogeni, M. Christofaki, L. Sifaki, D. Georgopoulos, G. Samonis. Aerosolized in combination with intravenous colistin vs. intravenous colistin in the treatment of ventilator-associated pneumonia: a matched case-control study. P 1545. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Vienna, Austria. 10-13 April, 2010.
5. D. Kofteridis, A. Valachis, **D. Dimopoulou**, S. Maraki, M. Christofaki, E. Dasis, G. Samonis. Risk factors of carbapenem resistant *Klebsiella*

pneumoniae infections: A case-case control study. K-241. 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Boston. September 12-15, 2010.

6. D. Kofteridis, **D. Dimopoulou**, A. Valachis, S. Maraki, A. Christidou, A. Thanasia, V. Theodorakopoulou, I. Aristeidou, N. Spervovasilis, G. Samonis. Polymicrobial bloodstream infections in patients with cancer. 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases and the 27th International Congress of Chemotherapy. Milan, Italy. 7-10 May, 2011.
7. D. Kofteridis, **D. Dimopoulou**, A. Valachis, S. Maraki, A. Thanasia, V. Theodorakopoulou, I. Aristeidou, N. Spervovasilis, G. Samonis. Evaluation of candiduria in patients with neoplasia. 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases and the 27th International Congress of Chemotherapy. Milan, Italy. 7-10 May, 2011.
8. D. Kofteridis, S. Maraki, **D. Dimopoulou**, A. Valachis, J. Papadakis, G. Samonis. Evaluation of tigecycline activity in clinical isolates. 2^{1st} European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases and the 2^{7th} International Congress of Chemotherapy. Milan, Italy. 7-10 May, 2011.
9. D. Kofteridis, **D. Dimopoulou**, S. Maraki, A. Valachis, M. Giaka, C. Alexopoulou, A. Andrianaki, G. Giourgouli, G. Samonis. Clinical features and outcome of infections due to pandrug-resistant Gram-negative bacteria. P 1299. 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. London, United Kingdom. 31 March - 3 April, 2012.
10. D. Kofteridis, A. Valachis, **D. Dimopoulou**, A. Christidou, A. Andrianaki, G. Giourgouli, S. Maraki, G. Samonis. Factors influencing non-*albicans* candidemia: A case-case-control study. 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). San Francisco. September 9-12, 2012.
11. **D. Dimopoulou**, I. Messaritakis, G. Samonis, G. Goulielmos, J. Papadakis, G. Brentzos, C. Choulaki, M. Fragaki, A. Valachis, D. P. Kofteridis. *Staphylococcus aureus* nasal carriage might be associated with vitamin D receptors polymorphisms in type 2 diabetes. 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). San Francisco. September 9-12, 2012.
12. **D. Dimopoulou**, G. Hamilos, G. Samonis, D.P. Kontoyiannis. Anidulafungin (ANF) Compared to Caspofungin (CAS) in a Non-Neutropenic Mouse Model of Invasive Candidiasis (IC) Caused by ANF-Susceptible (S) *C. parapsilosis* (*C.p*) Isolates with Different Degrees of In Vitro Non-Susceptibility (NS) to CAS: MIC Does Not Tell the Whole Story. 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). San Francisco. September 9-12, 2012.

13. S. Maraki, **D. Dimopoulou**, A.S. Karageorgiadis, A. Kyvernitakis, S. Lionakis, D.P. Kofteridis, G. Samonis Effect of caspofungin, anidulafungin and micafungin on the gastrointestinal colonisation of mice by *Candida albicans*. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Berlin, Germany. 27 - 30 April, 2013.
14. G. Samonis, K.Z. Vardakas, **D. Dimopoulou**, G. Papadimitriou, D. Kofteridis, S. Maraki, M. Karanika, M.E. Falagas. *Clostridium difficile* in Crete, Greece: epidemiology, microbiology and clinical disease. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Berlin, Germany. 27 - 30 April, 2013.
15. D. Kofteridis, A. Kafetzakis, **D. Dimopoulou**, S. Maraki, A. Christidou, A. Andrianaki, E. Tavlas, J. Papadakis, G. Samonis. Epidemiological study of diabetic foot infections in Crete, Greece. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Berlin, Germany. 27 - 30 April, 2013.
16. S. Maraki, **D. Dimopoulou**, D.P. Kofteridis, G. Samonis. In vitro activities of linezolid, tigecycline, quinupristin/dalfopristin, and daptomycin against vancomycin-resistant enterococci. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Berlin, Germany. 27 - 30 April, 2013.
17. D. Kofteridis, **D. Dimopoulou**, A. Andrianaki, G. Giourgouli, S. Maraki, A. Christidou, J. Papadakis, A. Valachis, G. Samonis. Clinical and bacteriological characteristics and risk factors for mortality in haematological patients with neutropenic fever. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Berlin, Germany. 27 - 30 April, 2013.

Ανακοινώσεις σε ελληνικά συνέδρια

1. **Δημοπούλου Δ**, Κοφτερίδης Δ, Βαλαχής Α, Χριστοφάκη Μ, Ροβίθη Μ, Κουτσουνάκη Ε, Μαράκη Σ, Γεωργούλιας Β, Σαμώνης Γ. Λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους. Σύγχρονες τάσεις στην Παθολογία. Ηράκλειο 29-31 Οκτωβρίου 2009.
2. **Δημοπούλου Δ**, Κοφτερίδης Δ, Σαμώνης Γ. Συγκριτική μελέτη αποτελεσματικότητας και ασφάλειας της ενδοφλέβιας κολιστίνης έναντι του συνδυασμού εισπνεόμενης και ενδοφλέβιας κολιστίνης σε ασθενείς με πνευμονία που σχετίζεται με τον αναπνευστήρα από gram αρνητικούς μικροοργανισμούς. 5ο Συνέδριο Παθολογίας. Σύγχρονες τάσεις στην Παθολογία. Ηράκλειο 20-22 Οκτωβρίου 2011.
3. **Δημοπούλου Δ**, Χαμηλός Γ, Τζαρδή Μ, Κοντογιάννης Δ.Π, Σαμώνης Γ. Ανιντουλαφουγκίνη έναντι (vs) Κασποφουγκίνης σε μοντέλο ποντικών διάχυτης καντιντίασης από στελέχη *C. parapsilosis* ευαίσθητα στην ανιντουλαφουγκίνη και με διαφορετικού βαθμού αντοχή στην κασποφουγκίνη. 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Ιατρικής Μυκητολογίας. Αθήνα 22-24 Νοεμβρίου 2013.

4. Κοφτερίδης Δ, Ανδριανάκη Α, Βαλαχής Α, Ζαχαριουδάκη Μ, Σπετσωτάκη Κ, Δαμιανάκη Α, Μαράκη Σ, Χρηστίδου Α, Αλεξοπούλου Χ, **Δημοπούλου Δ**, Σαμώνης Γ. Ανάλυση 53 ασθενών με πολυμικροβιακές βακτηριαμίες στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας. 15ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λοιμώξεων. Αθήνα 6-8 Μαρτίου 2015.

Πλήρεις δημοσιεύσεις σε Πρακτικά Συνεδρίων

1. **Δημοπούλου Δ**, Σαμώνης Γ. Το σύνδρομο ψυχικής εξουθένωσης στην Ογκολογία. Πρακτικά 4^{ου} Συνεδρίου Ογκολογίας στην Πρωτοβάθμια Περίθαλψη «Κατ'οίκον νοσηλεία». Αθήνα 3-4 Δεκεμβρίου 2010. Σελίδες 35-36.
2. **Δημοπούλου Δ**, Σαμώνης Γ. Ο ρόλος του γαστρεντερικού συστήματος στην συστηματική καντιντίαση. Πρακτικά 4ου Πανελληνίου Συνεδρίου Ελληνικής Εταιρείας Ιατρικής Μυκητολογίας. Αθήνα 11-13 Νοεμβρίου 2011.

IV. ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΦΡΟΝΤΙΣΤΗΡΙΩΝ – ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΩΝ ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ

1. European Resuscitation Council BLS PROVIDER COURSE. Heraklion 27 November 2005.
2. European Resuscitation Council AED PROVIDER COURSE. Heraklion 27 November 2005.
3. 1^ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο «AIDS: Επιδημιολογική, Θεραπευτική και Κοινωνική διάσταση». Ηράκλειο 8 Δεκεμβρίου 2006.
4. Κλινικό Φροντιστήριο «Νεότερα δεδομένα σε πνευμονικές παθήσεις». 13^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας. Αθήνα 20-22 Απριλίου 2007.
5. Προσυνεδριακό σεμινάριο Βασικής Υποστήριξης της Ζωής και απινίδωσης (BLS) σε βρέφη και παιδιά. 18^ο Παγκρήτιο Πανεπιστημιακό Παιδιατρικό συμπόσιο. Χερσόνησος, Ηρακλείο Κρήτης 14-16 Μαρτίου 2008.
6. 17^ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας. Ηράκλειο 4-8 Νοεμβρίου 2009.
7. Εμβόλια 2010. Μετεκπαιδευτικά Θέματα Λοιμώξεων και Ανοσίας. Ηράκλειο, 19 Ιουνίου 2010.
8. 18^ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας. Ηράκλειο 4-6 Νοεμβρίου 2010.

9. 4^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Ιατρικής Μυκητολογίας. «Ζυγομύκωση-Φουσαρίωση». Αθήνα 27 Νοεμβρίου 2010.
10. Σεμινάριο στα πλαίσια της συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης για Παθολόγους, Γενικούς Ιατρούς και Ιατρούς Παθολογικών Υποειδικοτήτων. Ανασκόπηση της Παθολογίας. Ηράκλειο 15, 29 Ιανουαρίου και 12 Φεβρουαρίου 2011.
11. Σεμινάρια Λοιμώξεων 2011: Ουρολοιμώξεις. Ηράκλειο, 10 Δεκεμβρίου 2011.
12. 5^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Ιατρικής Μυκητολογίας. «Ανοσοκαταστολή και Μυκητιάσεις». Αθήνα 8 Δεκεμβρίου 2012.
13. 6^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Ιατρικής Μυκητολογίας. «Μυκητικές λοιμώξεις σε ευαίσθητους και βαρέως πάσχοντες ασθενείς». Αθήνα 6 Δεκεμβρίου 2014.
14. Πρόγραμμα Κατάρτισης Επαγγελματιών υγείας με τίτλο «Το βιβλίο από τους πρώτους μήνες της ζωής του παιδιού», Αθήνα 28 Φεβρουαρίου 2015.
15. 11^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Παιδιατρικής "Ημέρες Παιδιατρικής Ενημέρωσης", Αθήνα 7-8 Μαρτίου 2015.
16. 9^ο Σεμινάριο Μητρικού Θηλασμού για επαγγελματίες υγείας, Αθήνα 9-13 Μαρτίου 2015.

V. ΣΥΓΓΡΑΦΗ ΚΕΦΑΛΑΙΩΝ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΒΙΒΛΙΑ

1. **Dimopoulou D.** and Sakellaris G. Development of the urogenital system. In: Sakellaris G. Essentials in Pediatric Urology. Research Signpost, Kerala, India, 2012, pp 1-7.

VI. ΑΛΛΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

Παρακολούθηση του 1st **Erasmus Intensive Programme in Primary Medical Health Care "Quality Care in a Multicultural Society"**. Nijmegen, The Netherlands. 7-19 June 2009.

VII. ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

1. Υποτροφία από το **Ίδρυμα Κρατικών Υπηρεσιών (Ι.Κ.Υ)** για άριστη επίδοση κατά το 3^ο έτος των σπουδών στο τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, (ακαδημαϊκό έτος 2005-2006).
2. Υποτροφία αριστείας από Πανεπιστήμιο Κρήτης – Κληροδότημα «Μαρίας Μιχαήλ Μανασσάκη» κατά την διάρκεια του 1^{ου} έτους εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής (2011-2012).
3. Υποτροφία αριστείας από Πανεπιστήμιο Κρήτης – Κληροδότημα «Μαρίας Μιχαήλ Μανασσάκη» κατά την διάρκεια του 2^{ου} έτους εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής (2012-2013).
4. Έπαινος καλύτερης εργασίας στο 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Ιατρικής Μυκητολογίας. Αθήνα 24 Νοεμβρίου 2013, με τίτλο «Ανινοουλαφουγκίνη έναντι (vs) Κασποφουγκίνης σε μοντέλο ποντικών διάχυτης καντιντίασης από στελέχη *C. parapsilosis* ευαίσθητα στην ανινοουλαφουγκίνη και με διαφορετικού βαθμού αντοχή στην κασποφουγκίνη».

Πρόλογος-Ευχαριστίες

Με το πέρας της διδακτορικής μου διατριβής, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον Καθηγητή Παθολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, κο Γεώργιο Σαμώνη. Η συνάντησή μου μαζί του ήταν μία από τις σημαντικότερες συγκυρίες της ζωής μου. Υπήρξε εξαιρετικός δάσκαλος και νιώθω ιδιαίτερα τυχερή που τον γνώρισα και συνεργάστηκα μαζί του. Ελπίζω να έχω την χαρά να συνεχίσουμε να συνεργαζόμαστε και στο μέλλον. Με την αφοσίωσή του στην επιστημονική μεθοδικότητα, την εμπειρία του, τον ενθουσιασμό του, την προτροπή του και την καθοδήγησή του ξεκίνησε αυτό το υπέροχο ταξίδι στον κόσμο της έρευνας και με την συμβολή του, έκανε όλη την πορεία ως εδώ πραγματικά συναρπαστική. Του είμαι ευγνώμων, όχι μόνο για την μέχρι τώρα σταδιοδρομία μου, αλλά και για την συμμετοχή του στην διαμόρφωση της επιστημονικής μου γνώσης και της προσωπικότητάς μου, αναδεικνύοντας τα προτερήματά μου και ταυτόχρονα, βελτιώνοντας τα ελαττώματά μου, ενώ συγχρόνως, με έκανε πιο υπεύθυνη και πιο διεκδικητική, αφού με εμπιστεύτηκε, παραχωρώντας μου αρμοδιότητες. Του είμαι ευγνώμων για το ενδιαφέρον του για μένα, για την υποστήριξή του και για όλα αυτά που μου δίδαξε...

Στην συνέχεια, θα ήθελα να εκφράσω την βαθύτατη ευγνωμοσύνη μου στον Επίκουρο Καθηγητή Παθολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, κο Διαμαντή Κοφτερίδη, επειδή είναι ο πρώτος άνθρωπος που μου έδειξε τον δρόμο για την έρευνα, ήδη από τα φοιτητικά μου χρόνια. Χάρη σε αυτόν, αποφάσισα να συνεχίσω αυτό το μαγικό ταξίδι... Και τελικά είχε δίκιο! Δεν το μετάνιωσα ούτε μια

στιγμή. Αντιθέτως, νιώθω πολύ τυχερή που το έζησα και γνώρισα αυτούς τους σημαντικότερους ανθρώπους. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την στήριξή του, την συνεχή καθοδήγησή του και τις συμβουλές του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ιατρό κο Γεώργιο Χαμηλό, με τον οποίο είχα την τιμή να συνεργαστώ μαζί του στο εργαστήριο και με βοήθησε με την ευφυΐα του, τις συμβουλές του και την έμπειρη καθοδήγησή του στην διεκπεραίωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, όχι μόνο στο τεχνικό κομμάτι των πειραμάτων, αλλά και στο επιστημονικό, διαδραματίζοντας καταλυτικό ρόλο στην πραγματοποίηση της έρευνας. Είναι εξαιρετικός επιστήμονας και άνθρωπος και για μένα η συνεργασία μου μαζί του ήταν πραγματικά μία εμπειρία!

Θα ήταν μεγάλη παράλειψη αν δεν εξέφραζα την βαθύτατη ευγνωμοσύνη μου και εκτίμηση προς το πρόσωπο του Καθηγητή Παθολογίας-Λοιμωξιολογίας του Πανεπιστημίου του Τέξας, κο Δημήτριο Κοντογιάννη, ο οποίος βασικά είχε την ιδέα της παρούσας μελέτης και με βοήθησε ουσιαστικά στην συγγραφή του άρθρου. Ήταν ιδιαίτερη τιμή για μένα η συνεργασία μας και η πολύτιμη συμμετοχή του στην διδακτορική μου διατριβή.

Οι ευχαριστίες μου δεν θα μπορούσαν να μην συμπεριλάβουν από το Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Κρήτης, την Μικροβιολόγο κα Σοφία Μαράκη για την εργαστηριακή της συνδρομή και την πολύτιμη υποστήριξη της, όχι μόνο στην διδακτορική μου διατριβή, αλλά και σε όλες τις μελέτες που πραγματοποίησε η ομάδα μας. Είναι μία εξαιρετική επιστήμονας, η συνεργασία μας ήταν απλά άψογη και την ευχαριστώ ιδιαίτερα.

Ευχαριστώ ολόκληρο το προσωπικό της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Κρήτης, που αποτέλεσε το δεύτερο σπίτι

μου και ήταν όλοι ανεξαιρέτως άψογοι και ευγενικοί απέναντί μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους επιβλέποντες της τριμελούς επιτροπής, την Καθηγήτρια Αιματολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, κα Ελένη Παπαδάκη, για την καθοδήγησή της, τις συμβουλές της, την βοήθειά της και φυσικά, τις συστάσεις της και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Παιδιατρικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, κο Εμμανουήλ Γαλανάκη, για την πολύτιμη βοήθειά του στην πραγματοποίηση της διδακτορικής διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα τους υπόλοιπους συμμετέχοντες στην επταμελή επιτροπή, κο Ιωάννη Γερμανάκη, κο Δημήτριο Μαυρουδή και κο Δημήτριο Γεωργόπουλο για την υποστήριξή τους και για την τιμή που μου έκαναν να είναι στην επιτροπή.

Αν μπόρεσε να φθάσει στο τέλος της αυτή η ερευνητική πορεία ήταν γιατί είχα την τύχη να περιβάλλομαι από ξεχωριστούς ανθρώπους που με εμπιστεύτηκαν, με στήριξαν και μου έδωσαν τον χώρο για να δημιουργήσω. Τους είμαι πραγματικά ευγνώμων και τους ευχαριστώ θερμά, που μου μετέδωσαν κάτι από τη μαγεία της επιστήμης και ελπίζω να συνεχίσω αυτή την πορεία στο μέλλον.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή

Η *Candida parapsilosis* αποτελεί ένα συχνό αίτιο διηθητικής καντιντίασης (ΔΚ). Οι εχινοκανδίνες (κασποφουγκίνη-CAS, μικαφουγκίνη-MIC και ανιντουλαφουγκίνη -ANF), έχουν ευρέως φάσματος μυκητοκτόνο δράση και αποτελούν θεραπεία εκλογής για την ΔΚ. Ωστόσο, παρουσιάζουν μειωμένη *in vitro* δραστηριότητα κατά της *C. parapsilosis* που προκαλεί “breakthrough” λοιμώξεις σε ασθενείς υπό θεραπεία με τα φάρμακα αυτά, ενώ, πρόσφατα, έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις κλινικής αποτυχίας, οφειλόμενες σε ανθεκτικά στην CAS στελέχη. Η αλλαγή στην επιδημιολογία των καντιντιάσεων προβληματίζει σχετικά με την εμπειρική θεραπεία της ΔΚ.

Ο βαθμός διασταυρούμενης αντοχής της *C. parapsilosis* στις εχινοκανδίνες *in vivo* δεν είναι ακόμα γνωστός και καλά κατανοητός. Επιπλέον, οι εχινοκανδίνες έχουν σημαντικές ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες, μέσω «αποκάλυψης» της β-γλυκάνης, του κύριου ανοσοδιεγερτικού μορίου του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα. Παρά την επισήμανση του ανοσοτροποποιητικού μηχανισμού των εχινοκανδινών, μεγάλο τμήμα της κλινικής δράσης τους κατά της *C. parapsilosis* παραμένει άγνωστο, καθώς συγκριτικές *in vivo* μελέτες είναι λίγες.

Ο σκοπός της μελέτης είναι να καθιερωθεί πειραματικό μοντέλο ΔΚ σε ανοσοεπαρκή ποντίκια, που μιμείται ανάλογες συνθήκες στον άνθρωπο, και να συγκριθεί η *in vivo* αποτελεσματικότητα της ANF και CAS κατά διαφορετικών στελεχών *C. parapsilosis* που είναι ευαίσθητα *in vitro* στην ανιντουλαφουγκίνη, ενώ παρουσιάζουν διαφορετικού βαθμού αντοχή *in vitro* στην CAS. Προσδοκούμε ότι τα

αποτελέσματα της μελέτης θα δώσουν σημαντικές πληροφορίες για την καλύτερη διαχείριση των λοιμώξεων από *C. parapsilosis*.

Υλικά και Μέθοδοι

Θηλυκά ανοσοεπαρκή BALB/c ποντίκια μολύνθηκαν ενδοφλεβίως με τρία διαφορετικά στελέχη *C. parapsilosis*, ευαίσθητα στην ANF και διαφορετικού βαθμού αντοχή στην CAS. Αφού βρέθηκε η ιδανική ποσότητα των ενέσιμων βλαστοσποριών του μύκητα, καθιερώθηκε το μοντέλο ΔΚ με εκτίμηση της επιβίωσης, ανάλυση του μυκητικού φορτίου στα όργανα των ζώων και καθημερινή μέτρηση της απώλειας βάρους.

Καθορίστηκε η δράση της CAS και ANF έναντι των 3 χρησιμοποιούμενων στελεχών *C. parapsilosis* ευαίσθητων στην ANF και διαφορετικού βαθμού αντοχής στην CAS. Τα ζώα χωρίστηκαν σε ομάδες κι έλαβαν ενδοπεριτοναϊκά CAS, ANF σε 2 δόσεις (1mg/Kg/ημέρα και 10mg/Kg/ημέρα) ή φυσιολογικό ορό (τα ζώα μάρτυρες). Για να επιβεβαιωθεί η ΔΚ και να εκτιμηθεί η δραστηριότητα της CAS σε σύγκριση με αυτήν της ANF, καταγράφηκε το μυκητικό φορτίο σε ήπαρ, σπλήνα και νεφρούς ποντικών που θανατώθηκαν μετά την μόλυνση. Παράλληλα, καταγράφηκε η απώλεια βάρους των ζώων, που θεωρείται δείκτης νοσηρότητας και έτσι, εκτιμήθηκε η συγκριτική δραστηριότητα των εχινοκανδινών κατά της ΔΚ από *C. parapsilosis*.

Μόλις η *in vivo* δραστηριότητα της ANF και της CAS έχει πλήρως διασαφηνιστεί, θα επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα σχετικά με την δράση της CAS με αυτή της ANF στα 3 στελέχη *C. parapsilosis*, μέσω της ιστοπαθολογικής ανάλυσης του μυκητικού φορτίου στα όργανα-στόχους.

Αποτελέσματα

Τα αρχικά πειράματα έδειξαν ότι το στέλεχος *C. parapsilosis* που είναι ανθεκτικό στην CAS παρουσιάζει μία τάση για εξασθενημένη επιθετικότητα στο συγκεκριμένο μοντέλο ΔΚ. Αντίθετα, το στέλεχος που είναι ευαίσθητο στην CAS είναι πιο επιθετικό, προκαλώντας τον θάνατο των ποντικών κατά την μόλυνση με την ίδια ποσότητα βλαστοσπορίων/ποντίκι (ποσοστό θνητότητας: CAS-S 100% vs CAS-I 11.1% vs CAS-R 0%, $P = 0.001$).

Στα ποντίκια που μολύνθηκαν με την ενδιάμεσης αντοχής στην CAS *C. parapsilosis*, και οι δύο εχινικανδίνες ανέδειξαν παρόμοια και σημαντική δραστηριότητα, όπως αποδείχτηκε από την κάθαρση του μυκητικού φορτίου στα όργανα των ζώων και τη μείωση της βαρύτητας της νόσου, βάσει της απώλειας βάρους.

Στα ποντίκια που μολύνθηκαν με το στέλεχος *C. parapsilosis* που είναι ανθεκτικό στην CAS, δεν υπήρχε καμία σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες θεραπείας, όσον αφορά την δράση των εχινοκανδινών έναντι του στελέχους αυτού. Ωστόσο, τα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με οποιαδήποτε εχινοκανδίνη και ιδιαίτερα στις υψηλές δόσεις, είχαν πιο γρήγορη ανάκαμψη και μειωμένη βαρύτητα λοίμωξης, σε σύγκριση με τα ποντίκια-μάρτυρες.

Στα ποντίκια που μολύνθηκαν με στέλεχος ευαίσθητο στην CAS, παρατηρήθηκε μείωση στο μυκητικό φορτίο σε όλα τα όργανα μετά από την χορήγηση CAS ή χαμηλής δόσης ANF. Η απώλεια βάρους ήταν μικρότερη στα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία, ενώ όλα τα ποντίκια που δεν έλαβαν καμία θεραπεία έχασαν σημαντικό βάρος και πέθαναν μετά την μόλυνση με το συγκεκριμένο στέλεχος *C. parapsilosis*.

Συμπεράσματα

Καθιερώθηκε ένα μοντέλο υποξείας ΔΚ από *C. parapsilosis* σε ανοσοεπαρκή ποντίκια, που μιμείται την παθοβιολογία των ανθρώπων και επιτρέπει την σύγκριση της δράσης των εχिनοκανδινών έναντι των διαφορετικών στελεχών *C. parapsilosis*.

Προέκυψαν σημαντικές ενδείξεις ότι εκτός από την αντιμυκητική τους δράση, οι εχινοκανδίνες κατέχουν και ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες. Διεπιστώθη ότι δεν υπάρχει συσχέτιση της *in vitro/in vivo* δραστηριότητας των εχινοκανδινών έναντι διαφορετικών στελεχών *C. parapsilosis* και προτείνεται ότι ένα σύμπλεγμα αλληλεπίδρασης ανοσοτροποποιητικών ιδιοτήτων και της απώλειας «fitness» του μύκητα, καθώς και της γνωστής φαρμακολογικής δράσης των εχινοκανδινών μπορεί να προκύψει *in vivo* σε ασθενείς με ΔΚ από στελέχη *C. parapsilosis* μη ευαίσθητα στην CAS.

ABSTRACT

Objectives

C. parapsilosis is one of the most common causes of invasive candidiasis. The echinocandins, including caspofungin (CAS) , micafungin (MICA) and anidulafungin (ANF), possess broad spectrum fungicidal activity and are currently considered the treatment of choice for many forms of invasive candidiasis. Importantly, these agents retain their activity against azole-resistant *Candida* spp. Nonetheless, the echinocandins demonstrate reduced *in vitro* activity against *C. parapsilosis*, whereas clinical failure due to CAS-resistant (CAS-R) *C. parapsilosis* isolates have been recently reported in patients receiving CAS, causing breakthrough infections to echinocandins. Overall, this recent shift in the epidemiology of *Candida* infections raises concerns about the optimal regimen for empirical treatment of invasive candidiasis.

However, the clinical implications of the differential activity of echinocandins against *C. parapsilosis* remain currently unknown, as comparative *in vivo* studies are completely lacking. Furthermore, because the echinocandins possess significant immunomodulatory properties that are mediated via beta-glucan unmasking, it is plausible that differences in the *in vitro* activity of echinocandins against *Candida* spp. may also result in significant quantitative and qualitative changes in antifungal host immune response *in vivo*.

The purpose of the present study was to establish a clinically relevant mouse model of invasive *C. parapsilosis* infection in immunocompetent mice, and to compare the *in vivo* activity of ANF and CAS in experimental candidemia caused by *C. parapsilosis* isolates that are sensitive *in vitro* to ANF but are resistant to CAS. The

degree of the *in vivo* cross-resistance among echinocandins and the fitness loss associated with caspofungin (CAS) non-susceptibility of *C. parapsilosis* are not well studied. Overall, we anticipate that the results of our *in vivo* studies in murine model of invasive candidiasis should provide important information on the optimal management of infections caused by this emerging *Candida* spp.

Materials and Methods

Female BALB/c mice were infected with three different ANF-susceptible isolates of *C. parapsilosis* with different degrees of non-susceptibility to CAS via injection of blastospores dissolved in 200 μ L of phosphate-buffered saline into the lateral tail veins. Initial experiments were performed to define the optimal *C. parapsilosis* inoculum (LD_{50}) for studying antifungal activity (inoculum range 10^5 - 10^7 blastospores). It will be established a mouse model of invasive candidiasis for evaluation of survival, assessment of fungal burden in organs and measurement of weight loss.

The efficacy of respective echinocandin regimens (CAS, ANF) against 3 *C. parapsilosis* isolates was analyzed. Starting 6 hours after infection with each of *C. parapsilosis* isolate, intraperitoneal administration of each echinocandin (CAS, ANF), in two doses (1 mg/kg and 10 mg/kg) corresponding to that used for treatment of invasive candidiasis in humans, or DMSO (control group) was administered once daily for 7 days or until the death of the animal. Fungal burden was measured in kidney, spleen and liver in selected mice (n=6) euthanized on day 2 after infection.

In addition, measurement of weight loss of infected mice, an established marker of disease severity, distributed to the evaluation of comparative efficacy of

echinocandins against invasive candidiasis of *C. parapsilosis*. To further evaluate differences in fungal burden of the organs in mice infected with CAS-S, CAS-I or CAS-R *C. parapsilosis* isolates, histopathological examination of the kidneys was performed in selected mice (n=3) euthanized on day 2 after infection and treated, as described above.

Results

Increasing CAS resistance was associated with reduced virulence of *C. parapsilosis* isolates (mortality rates CAS-S 100% vs CAS-I 11.1% vs CAS-R 0% P = 0.001). The CAS-S isolate was more virulent in comparison to the other two isolates, while there was a trend towards reduced mortality following infection with CAS-R isolate when compared to the CAS-I isolate.

High doses of either echinocandin were active against infection with CAS-I isolate when assessed by fungal burden reduction and weight gain. However, no reduction in fungal burden in mice infected with the CAS-R isolate following treatment with either echinocandin in both doses. Nevertheless, mice infected with the CAS-R isolate had reduced disease severity following echinocandin treatment, suggesting that echinocandins have activity *in vivo*, even against echinocandin-resistant strains. In animals infected with the CAS-S strain, high and low dose doses of CAS or low dose of ANF treatment resulted in lower organ fungal burdens versus controls. Weight loss was less in mice infected by the CAS-S *C. parapsilosis* following high dose CAS or ANF treatment, while all mice of the control group lost substantial weight and died on day 5 after infection.

Conclusions

A reproducible model of *C. parapsilosis* IC in immunocompetent mice was established that mimics the pathobiology of hematogenous infection in humans and allows comparisons of antifungal drug activity based on differences in fungal burden and weight loss of infected mice. It is suggested that echinocandins are effective antifungal agents against *C. parapsilosis* infections and concurrently, they possess significant immunomodulatory properties. There is no straightforward *in vitro/in vivo* correlation of echinocandin activity against *C. parapsilosis* displaying non-susceptibility to CAS. A complex interplay of residual echinocandin activity, decreased virulence and/or fitness of isolates with altered cell wall, and possible immunomodulatory effects, can be encountered *in vivo* during infection with CAS-non-susceptible *C. parapsilosis* isolates.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. Διηθητική Καντιντίαση

Γενικά

Ο όρος «διηθητική καντιντίαση» περιλαμβάνει την καντινταϊμία, την διάχυτη καντιντίαση με προσβολή εν τω βάθει οργάνων, ενδοκαρδίτιδα και μηνιγγίτιδα, ενώ δεν περιλαμβάνει επιπολείς και λιγότερο σοβαρές νόσους, όπως την στοματοφαρυγγική και οισοφαγική καντιντίαση [1]. Η επίπτωση της διάχυτης καντιντίασης έχει αυξηθεί δραματικά κατά την διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών. Τα είδη *Candida* παραμένουν οι κύριες αιτίες νοσοκομειακών λοιμώξεων, και ιδιαίτερα σε ανοσοκατεσταλμένους και σε νοσηλευόμενους ασθενείς με σοβαρά υποκείμενα νοσήματα και ενδοφλέβιους καθετήρες [2]. Η *Candida spp.* αντιπροσωπεύει την 4^η και 6^η πιο συχνή αιτία νοσοκομειακών λοιμώξεων στις Η.Π.Α. και στην Ευρώπη, αντίστοιχα [3,4]. Το 8-10% των νοσοκομειακών μικροβιαμιών στις Η.Π.Α. οφείλεται στα είδη *Candida* [5] και το ποσοστό αυτό αυξάνεται σημαντικά στις μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) [6].

Αρκετοί παράγοντες παίζουν ρόλο στην αύξηση των μυκητικών λοιμώξεων. Ο πιο σημαντικός είναι ο μεγάλος αριθμός των ανοσοκατεσταλμένων ασθενών, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από καταστροφή της φυσικής άμυνας της επιδερμίδας και των βλεννογόνων, διαταραχές στον αριθμό και την λειτουργία των ουδετερόφιλων ή της κυτταρικής ανοσίας, δυσλειτουργία του μεταβολισμού και ακραίες ηλικίες [7]. Η αυξημένη χρήση των ευρέως φάσματος αντιμικροβιακών, οι κυτταροτοξικές χημειοθεραπείες και η μεταμόσχευση, καθώς και περιβαλλοντικοί παράγοντες,

οδηγούν εππλέον σε αύξηση του κινδύνου των συχνών και σπάνιων ευκαιριακών λοιμώξεων από μύκητες [8].

Η *C. albicans* αποτελεί το πιο συχνό είδος *Candida* που προκαλεί διάχυτη καντιντίαση, σε ποσοστό 40-60% των περιπτώσεων, που ακολουθείται από την *C. glabrata*, την *C. parapsilosis*, την *C. tropicalis* και την *C. krusei*, σε ποσοστά 10-25% το καθένα [6,9]. Η αύξηση της επίπτωσης των μυκητιάσεων οδήγησε στην εισαγωγή της φλουκαναζόλης την δεκαετία του 1990, η οποία συνδύαζε καλή δραστηριότητα εναντίον της *C. albicans* με ελάχιστη τοξικότητα [10]. Σε πρόσφατες μελέτες, παρατηρείται μία αύξηση των non-*albicans* στελεχών και αυτό το γεγονός πιθανώς οφείλεται στην υπερβολική χρήση των αζολών, αφού πολλά από τα συγκεκριμένα στελέχη έχουν μειωμένη ευαισθησία στην φλουκαναζόλη [11,12].

Παράγοντες κινδύνου

Οι παράγοντες κινδύνου της καντιντιαμίας και της διηθητικής καντιντίας έχουν μελετηθεί και αναγνωρισθεί και δεν έχουν αλλάξει ουσιαστικά τις τελευταίες δεκαετίες. Αυτοί περιλαμβάνουν την προηγούμενη χορήγηση ευρέως φάσματος αντιμικροβιακών, την χημειοθεραπεία, τον αποικισμό του βλεννογόνου με *Candida spp.*, τους ενδαγγειακούς καθετήρες (και ιδιαίτερα τους κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες), την ολική παρεντερική διατροφή, την ουδετεροπενία, την προηγούμενη χειρουργική επέμβαση (και ιδίως, του γαστρεντερικού) και τη νεφρική ανεπάρκεια ή αιμοδιάλυση [13] (πίνακας 1). Πρόσφατα, το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στους μη ουδετεροπενικούς που νοσηλεύονται στη ΜΕΘ [14]. Σε αυτούς τους ασθενείς, οι παράγοντες κινδύνου διηθητικής καντιντίας φαίνονται στον πίνακα 2, με τον πιο σημαντικό η παρατεταμένη παραμονή στην ΜΕΘ [14].

Παράγοντες κινδύνου	Πιθανός ρόλος στην λοίμωξη
Αντιμικροβιακοί παράγοντες	Προάγει αποικισμό/ ενδαγγειακή πρόσβαση
Χρήση κορτικοστεροειδών	Ανοσοκαταστολή
Ηλικία	Ανοσοκαταστολή
Χημειοθεραπεία	Ανοσοκαταστολή/διαταραχή των βλεννογόνων
Κακοήθεια	Ανοσοκαταστολή
Προηγούμενος αποικισμός	Μετανάστευση μέσω των βλεννογόνων
Καταστολή της έκκρισης του γαστρικού οξέος	Αποικισμός/ μετανάστευση
Ενδαγγειακός καθετήρας	Άμεση αγγειακή
Ολική παρεντερική διατροφή	είσοδος/υπεργλυκαιμία/επιμόλυνση
Ουδετεροπενία (<500/mm ³)	Ανοσοκαταστολή
Προηγούμενο χειρουργείο (γαστρεντερικού)	Άμεση αγγειακή είσοδος/οδός μόλυνσης
Μηχανικός αερισμός	Οδός μόλυνσης/ Ανοσοκαταστολή
Νεφρική ανεπάρκεια-Αιμοδιάλυση	Ανοσοκαταστολή
Κακή θρέψη	Έκθεση σε παθογόνα και επιπλέον παράγοντες κινδύνου
Νοσηλεία σε νοσοκομείο ή ΜΕΘ	
Σοβαρότητα νόσου	Ανοσοκαταστολή/επεμβατικές τεχνικές

Πίνακας 1: Παράγοντες καντινταιμίας σε νοσηλευόμενους ασθενείς

Η διηθητική καντιντίαση παρουσιάζει ένα υψηλό ποσοστό θνητότητας, περίπου στο 40-50% και αυξάνεται ακόμα περισσότερο σε ασθενείς που νοσηλεύονται στη ΜΕΘ [1]. Για αυτούς τους λόγους, είναι αναγκαία η ανάπτυξη κάποιων στρατηγικών για την εκτίμηση του κινδύνου, που θα έχουν ως σκοπό να προβλέπουν τον αληθινό κίνδυνο της νόσου και να αναγνωρίζουν αποτελεσματικά τους ασθενείς, με στόχο τις όσο το δυνατόν πιο έγκαιρες διαγνωστικές και θεραπευτικές παρεμβάσεις (προφυλακτική ή εμπειρική θεραπεία) και επομένως, να μειώσουν την θνητότητα που σχετίζεται με την συγκεκριμένη λοίμωξη [13].

Παρατεταμένη διάρκεια νοσηλείας
Σακχαρώδης διαβήτης
Νεφρική ανεπάρκεια
Αιμοδιάλυση
Ευρέως φάσματος αντιμικροβιακά
Κεντρικοί φλεβικοί καθετήρες
Ολική παρεντερική διατροφή
Ανοσοκατασταλτικά φάρμακα
Καρκίνος και χημειοθεραπεία
Σοβαρή οξεία παγκρεατίτιδα
Αποικισμός <i>Candida</i> σε διαφορετικά σημεία
Χειρουργείο
Μεταμόσχευση συμπαγούς οργάνου ή μυελού των οστών

Πίνακας 2: Παράγοντες κινδύνου διηθητικής καντιντίας σε ασθενείς που νοσηλεύονται στην μονάδα εντατικής θεραπείας

Διάγωση

Το επόμενο βήμα για την χορήγηση της κατάλληλης θεραπείας είναι η ταυτοποίηση του μικροοργανισμού. Σύμφωνα με τις οδηγίες του ECIL1, πρέπει να διενεργείται δοκιμασία για την ευαισθησία των αντιμυκητικών στα στελέχη *Candida*, που απομονώθηκαν από το αίμα ή από άλλα στείρα υλικά, με σκοπό να καθοριστούν οι αιτίες της μη ανταπόκρισης στην θεραπεία ή της αποτυχίας της μικροβιολογικής εκρίζωσης, να υποστηριχθεί μία αλλαγή στην αρχική αντιμυκητική αγωγή ή μία αλλαγή από ενδοφλέβια αντιμυκητική θεραπεία σε από του στόματος αζόλη [15].

Έχουν δημοσιευτεί αρκετές ειδικές τεχνικές για την εκτίμηση της *in vitro* ευαισθησίας των διάφορων ειδών *Candida* στα αντιμυκητικά φάρμακα. Οι πιο ευρέως διαδεδομένες και εφαρμοζόμενες είναι αυτές που δημοσιεύτηκαν από το Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) στις Η.Π.Α. [16, 17] και από το European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [18]. Αν και αυτές οι δύο μέθοδοι διαδοχικών αραιώσεων δεν είναι ταυτόσημες, αφού διαφέρουν σε αρκετά σημεία, καταλήγουν σε παρόμοια επίπεδα της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration -MIC) για τα πολυένια, τις αζόλες και τις εχινοκανδίνες, εκτός από κάποιες εξαιρέσεις [19-22]. Επίσης, κλινικά καθοριστικά όρια για την σωστή επιλογή της θεραπείας-clinical breakpoints (CBP) χρησιμοποιούνται σήμερα για την ταξινόμηση των αποτελεσμάτων MIC σε ευαίσθητα (Sensitive-S), ενδιάμεσης αντοχής (Intermediate-I) και ανθεκτικά (Resistant-R) [10]. Στον πίνακα 3, φαίνονται η *in vitro* ευαισθησία κλινικών στελεχών *Candida spp.* στις εχινοκανδίνες (ανιντουλαφουγκίνη, κασποφουγκίνη και μικάφουγκίνη) [23].

Θεραπεία

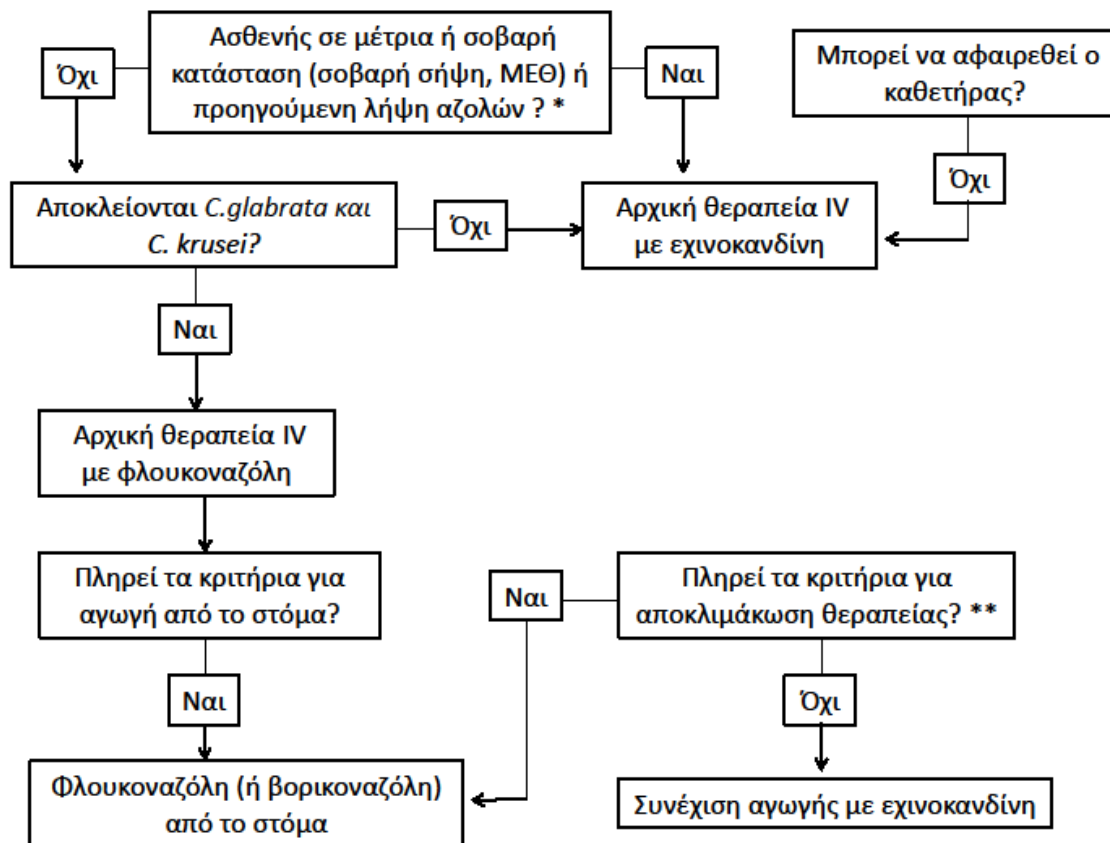
Η θεραπεία της διηθητικής καντιντίασης στηρίζεται στην όσο το δυνατόν πιο έγκαιρη χορήγηση αντιμυκητικών που ανήκουν στην οικογένεια είτε των πολυενίων, είτε των αζολών, είτε των εχινοκανδινών [24,25]. Η έγκαιρη και κατάλληλη θεραπεία είναι αποτελεσματική για την μείωση της θνητότητας που σχετίζεται με την καντιντίαση. Η αρχική επιλογή του αντιμυκητικού παράγοντα εξαρτάται από το είδος και την ευαισθησία της *Candida* που απομονώνεται και από παράγοντες σχετικά με τον ξενιστή. Αν η 1^η γραμμής αντιμυκητική θεραπεία είναι εμπειρική, τότε η επιλογή πρέπει να βασίζεται στην τοπική επιδημιολογία, στην πιθανή έκθεση στις αζόλες και στην παρουσία αιμοδυναμικής αστάθειας. Η *C. albicans*, που είναι ευαίσθητη στην φλουκαναζόλη, θεωρείται το πιο κοινό είδος που προκαλεί καντινταιμία σε ασθενείς που νοσηλεύονται στη ΜΕΘ. Ωστόσο, όλο και περισσότερα στελέχη non-*albicans* απομονώνονται στην κλινική πράξη, που είναι ανθεκτικά στις αζόλες, λόγω της ευρείας χρήσης των αντιμυκητικών αυτών [25].

Πίνακας 3: *In vitro* ευαισθησία κλινικών στελεχών *Candida spp.* στις εχινοκανδίνες (ανιντουλαφουγκίνη, κασποφουγκίνη και μικαφουγκίνη).

Σύμφωνα με τις οδηγίες του IDSA (Infectious Diseases Society of America), η επιλογή της αντιμυκητικής θεραπείας θα πρέπει να βασίζεται στην κλινική κατάσταση του ασθενούς, στις γνώσεις του θεράποντα ιατρού για το είδος του μύκητα και τις ευαισθησίες του στα αντιμυκητικά, στην τοξικότητα του φαρμάκου, στα σημεία δυσλειτουργίας οργάνου, στην κάθαρση του φαρμάκου και στην προηγούμενη χορήγηση αντιμυκητικών παραγόντων [24,25]. Οι αζόλες είναι μυκητοστατικοί παράγοντες, ενώ τα πολυένια και οι εχινοκανδίνες είναι μυκητοκτόνα και προτιμούνται σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς. Αν το είδος *Candida* είναι άγνωστο, είτε η φλουκαναζόλη, είτε μία εχινοκανδίνη είναι κατάλληλη

θεραπεία 1^{ης} γραμμής. Μία εχινοκανδίνη προτείνεται σε περιπτώσεις, όπου η νόσος είναι σοβαρή ή όταν έχει χορηγηθεί προηγουμένως αζόλες, είτε για προφύλαξη, είτε για θεραπεία, ενώ η φλουκαναζόλη συνιστάται σε περιπτώσεις, όπου δεν υπάρχει σοβαρή νόσος ή προηγούμενη έκθεση σε αζόλες. Αν ο ασθενής είναι σταθερός και αφού ταυτοποιηθεί ο μύκητας, τότε η θεραπεία με εχινοκανδίνη μπορεί να αλλαχθεί σε θεραπεία με αζόλη. Οι εχινοκανδίνες θεωρούνται ως 1^{ης} επιλογής θεραπεία για τις λοιμώξεις από *C. glabrata*, ενώ η φλουκαναζόλη για τις λοιμώξεις από *C. parapsilosis* [26,27]. Σε αιματολογικούς ή ουδετεροπενικούς ασθενείς, καθώς και σε ασθενείς στη ΜΕΘ, προτιμάται η θεραπεία με εχινοκανδίνες ή με αμφοτερικίνη-Β, και όχι με φλουκαναζόλη, λόγω της αυξημένης επίπτωσης των ειδών *Candida* με αντοχή στις αζόλες [27,28].

Η αφαίρεση όλων των κεντρικών φλεβικών καθετήρων προτείνεται ως η αρχική μη φαρμακευτική αντιμετώπιση, και ιδιαίτερα σε μη ουδετεροπενικούς ασθενείς [25]. Η *C. parapsilosis* συχνά συνδέεται με τον κεντρικό φλεβικό καθετήρα και απαιτεί την αφαίρεσή του ακόμα και σε ουδετεροπενικούς ασθενείς [25]. Η συνιστώμενη διάρκεια θεραπείας της καντινταιμίας, χωρίς την παρουσία επιμένουσας μυκηταιμίας ή μεταστατικών επιπλοκών είναι τουλάχιστον 2 εβδομάδες μετά την τελευταία θετική καλλιέργεια αίματος. Η θεραπεία διαρκεί πολύ περισσότερο σε ασθενείς με ενδοκαρδίτιδα, μηνιγγίτιδα και εν τω βάθει λοιμώξεις [26]. Ένας αλγόριθμος σχετικά με τη θεραπεία της διηθητικής καντιντίασης σε μη-ουδετεροπενικούς ασθενείς φαίνεται στο διάγραμμα 1 [25].



Διάγραμμα 1: Αλγόριθμος για τη θεραπεία της διηθητικής καντιντίασης σε μη-ουδετεροπενικούς ασθενείς. * Αιμοδυναμική αστάθεια ή/και ανεπάρκεια οργάνων, ασθενείς στη ΜΕΘ. **Κλινική βελτίωση, εξαφάνιση των κλινικών και παρακλινικών σημείων φλεγμονής, παθογόνο ευαίσθητο στην φλουκοναζόλη ή βορικοναζόλη, επαρκής γαστρεντερική λειτουργία για απορρόφηση.

Πρόληψη-Προφύλαξη

Η πρόληψη της διηθητικής καντιντίασης είναι επίσης πολύ σημαντική. Το πρώτο βήμα είναι η δημιουργία προγραμμάτων για την καλύτερη ενημέρωση και συμμόρφωση με την υγιεινή των χεριών [29]. Επιπρόσθετες στρατηγικές πρέπει να υιοθετηθούν για την σωστή τοποθέτηση και περιποίηση των κεντρικών φλεβικών καθετήρων [2,30]. Τέλος, ο έλεγχος της υπερβολικής χορήγησης αντιμικροβιακών παραγόντων, και ιδιαίτερα εκείνων με δραστικότητα κατά των αναερόβιων, είναι ένας σημαντικός τρόπος πρόληψης της καντινταϊμίας [13,31]. Η αντιμυκητική

προφύλαξη πρέπει να χορηγείται μόνο όταν τα παραπάνω μέτρα έχουν αποτύχει και ιδιαίτερα, σε ασθενείς που νοσηλεύονται στη ΜΕΘ [29]. Είναι αποτελεσματική στην μείωση της μυκητίασης του βλεννογόνου και της διηθητικής καντιντίασης σε ουδετεροπενικούς ασθενείς [32,33]. Η χρήση των αζολών ως προφυλακτική αγωγή μείωσε τον κίνδυνο της διηθητικής καντιντίασης σε ποσοστό 50-80% και επομένως, και της θνητότητας [34]. Περαιτέρω μελέτες πρέπει να διενεργηθούν για να διευκρινιστεί ο ρόλος των εχινοκανδινών στην προφύλαξη της καντινταμίας σε ασθενείς ουδετεροπενικούς ή νοσηλευόμενους στη ΜΕΘ [13,34].

B. *Candida parapsilosis*: Ένας αναδυόμενος μύκητας

Γενικά

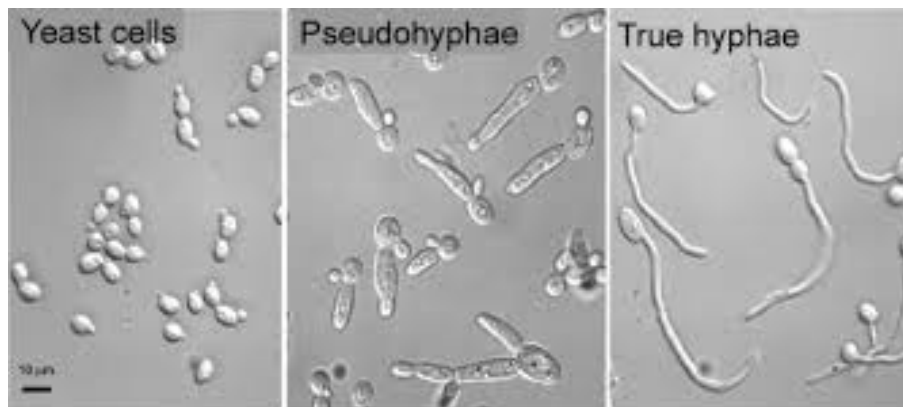
Η επίπτωση της *C. parapsilosis* έχει αυξηθεί σημαντικά την τελευταία δεκαετία. Στην πραγματικότητα, αναφορές αποδεικνύουν ότι η *C. parapsilosis* συχνά αποτελεί το δεύτερο πιο συχνό είδος *Candida* που απομονώνονται από τις καλλιέργειες αίματος [3,35-37]. Σε μερικά νοσοκομεία της Ευρώπης [3], της Ασίας [38] και της Νότιας Αμερικής [39], η επίπτωση της *C. parapsilosis* είναι πιο συχνή και από την επίπτωση της *C. albicans*.

Η *C. parapsilosis* απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον Ashford από τα κόπρανα ενός ασθενούς με διάρροια στο Πουέρτο Ρίκο, το 1928 [40]. Το είδος αυτό ονομάστηκε *Monilia parapsilosis*, για να το διακρίνουν από το πιο συχνό είδος *Monilia psilosis*, το γνωστό ως σήμερα *C. albicans*. Αν και αρχικά θεωρήθηκε μη παθογόνο, η *C. parapsilosis* αναγνωρίστηκε ως αιτιολογικός παράγοντας μιας θανατηφόρας περίπτωσης ενδοκαρδίτιδας σε έναν χρήστη ναρκωτικών το 1940 [41]. Σε αυτό το σημείο, οι ερευνητές συνέδεσαν την λοίμωξη με εξωγενή παραγωγή της *C. parapsilosis*, το οποίο προμήνυε την σχέση της *C. parapsilosis* με επεμβατικές ιατρικές πράξεις και όργανα, καθώς και με διαλύματα διατροφής.

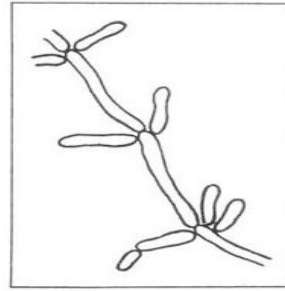
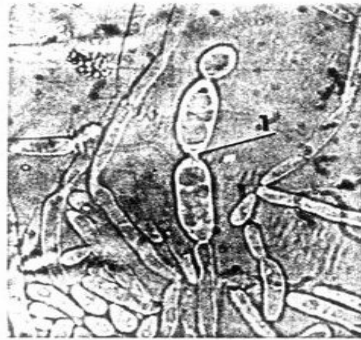
Μέχρι το 2005, η *C. parapsilosis* ταξινομήθηκε σε 3 ομάδες, τις I, II και III. Περαιτέρω γενετικές μελέτες απέδειξαν σημαντικές διαφορές που οδήγησαν στην ανακάλυψη και αντικατάσταση των ομάδων I-III με τα 3 ακόλουθα είδη, την *C. parapsilosis*, την *C. orthopsilosis* και την *C. metapsilosis* [42]. Εντούτοις, στην πλειοψηφία των κλινικών περιπτώσεων, η *C. parapsilosis* είναι υπεύθυνη για την εκδήλωση νόσου και είναι πιο επιθετική, με μεγαλύτερη λοιμογόνο δύναμη σε σχέση με τα άλλα είδη. Επίσης, λίγα μικροβιολογικά εργαστήρια μπορούν να

διακρίνουν αυτά τα 3 είδη και γι'αυτό, δεν υπάρχουν ακριβή στοιχεία για τον διαχωρισμό τους.

Το σχήμα των κυττάρων της *C. parapsilosis* είναι είτε οβάλ, είτε κυκλικό, είτε κυλινδρικό. Όταν αναπτύσσεται σε Sabouraud Dextrose agar, οι αποικίες της είναι λευκές, κρεμώδεις, λείες ή ρυτιδωμένες. Σε αντίθεση με άλλα είδη *Candida*, δεν σχηματίζει αληθινές υφές, και εμφανίζεται είτε σε μορφή σπόρου-μύκητα, είτε σε μορφή ψευδοϋφής [43]. Οι ψευδοϋφές οφείλονται σε έναν συνδυασμό αμινοξέων, ιδιαίτερα, στην κιτρουλλίνη, η οποία δημιουργεί σημαντικές αλλαγές στην μορφολογία των κυττάρων και των αποικιών [44]. Ο φαινότυπος των αποικιών του μύκητα είναι πιο λείος ή σαν κρατήρας, ενώ ο φαινότυπος των ψευδοϋφών είναι ρυτιδωμένος ή ομόκεντρος [43].



Εικόνα 1: Κυριότερες μορφές ειδών *Candida*. Συγκεκριμένα, η *C. parapsilosis*, εμφανίζεται με τις δύο πρώτες μορφές, τις ψευδοϋφές και τα βλαστοσπόρια.



Εικόνα 2: Ψευδοϋφές της *C. parapsilosis*.

Η *C. parapsilosis* αποτελεί τυπικά μέρος της χλωρίδας της ανθρώπινης επιδερμίδας και η παθογένειά της περιορίζεται μέσω της εξωτερικής κάψας του κυττάρου. Έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε διαλύματα ολικής παρεντερικής διατροφής και να σχηματίζει biofilms σε καθετήρες και άλλες συσκευές, να μεταδίδεται ενδονοσοκομειακά μέσω της διασποράς των χεριών και να επιμένει να αναπτύσσεται σε νοσοκομειακό περιβάλλον [45]. Η *C. parapsilosis* είναι συχνή σε βαρέως πάσχοντα νεογνά, προκαλώντας περισσότερο από το 1/4 των διηθητικών καντιντιάσεων σε χαμηλού βάρους γέννησης νεογνά στο Ηνωμένο Βασίλειο και περίπου το 1/3 των νεογνικών καντινταιμιών στην Νότια Αμερική [37,46]. Επιπρόσθετα, αποτελεί το πιο κοινό μύκητα που απομονώνεται σε ΜΕΘ νεογνών, όπου συχνά συνδέεται με νεογνική θνητότητα [46].

Από την δεκαετία του 1980, έχει παρατηρηθεί μία σημαντική αύξηση των καντινταιμιών που οφείλονται σε non-*albicans* είδη *Candida*, ιδιαίτερα σε *C. glabrata* στις Η.Π.Α. και σε *C. parapsilosis* και *C. tropicalis* στην Ευρώπη, στον Καναδά και στην Λατινική Αμερική [35]. Αν και η *C. parapsilosis* είναι λιγότερο μολυσματικό είδος από την *C. albicans*, έχει αυξηθεί περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο είδος *Candida* σε επίπτωση από το 1990.

Επίπτωση

Η *C. parapsilosis* δεν θεωρείται ένα ανθρώπινο παθογόνο μόνο, αφού έχει απομονωθεί από άλλες μη ανθρώπινες πηγές, όπως κατοικίδια ζώα, έντομα, χώμα και θαλάσσιο περιβάλλον [47]. Αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου και απομονώνεται συχνά από τα ανθρώπινα χέρια και μπορούν να εξελιχθούν σε ευκαιριακά παθογόνα σε ευαίσθητους οργανισμούς-ξενιστές.

Η απομόνωση της *C. parapsilosis* αυξάνεται παγκοσμίως. Είναι το δεύτερο πιο συχνό είδος *Candida* που απομονώνεται σε φυσιολογικά στείρα σημεία του σώματος των νοσηλευόμενων ασθενών. Αποτελεί το 15.5% των ειδών *Candida* που απομονώνονται στην Βόρεια Αμερική, το 16.3% στην Ευρώπη και το 23.4% στην Νότια Αμερική, με την *C. albicans* να υπερέχει σε ποσοστά 51.5%, 47.8% και 36.5%, αντίστοιχα [48]. Σε άλλες μελέτες, η *C. parapsilosis* υπολογίζεται μόνο στο 6.1% των στελεχών που απομονώνονται, με πρώτη την *C. albicans* (65.6%) και ακολουθούν η *C. glabrata* (11.1%), και η *C. tropicalis* (6.9%) [49]. Ωστόσο, η επίπτωση της *C. parapsilosis* αυξήθηκε από 4.8% (1997-2000) σε 6.6% (2001-2005). Σε μία μελέτη, η *C. albicans* απομονώθηκε στο 73.2% των ασθενών, ενώ η *C. parapsilosis* μόνο στο 4.2% των ασθενών. Ωστόσο, η *C. parapsilosis* απομονώθηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό από το αίμα και από ενδαγγειακούς καθετήρες (34.3%) από ό,τι η *C. albicans* (8.5%) [50]. Επομένως, η επίπτωση της διηθητικής καντιντίασης από *C. parapsilosis* ποικίλλει ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή και επηρεάζεται από την υποκείμενη κλινική κατάσταση των ασθενών.

Παράγοντες κινδύνου

Η διηθητική καντιντίαση που προκαλείται από *C. parapsilosis*, μπορεί να συμβεί χωρίς προηγούμενο αποικισμό και συχνά μεταδίδεται οριζόντια από μολυσματικές εξωτερικές πηγές, όπως ιατρικές συσκευές ή υγρά, τα χέρια του ιατρικού και νοσηλευτικού προσωπικού, προσθετικές συσκευές και καθετήρες.

Η αύξηση της συχνότητας των λοιμώξεων από *C. parapsilosis* έχει συσχετιστεί με μία ποικιλία παραγόντων κινδύνου που περιλαμβάνουν την εκλεκτική ικανότητα του μικροοργανισμού να αναπτύσσεται σε διαλύματα διατροφής, και την σχέση του με τις ενδαγγειακές συσκευές και τα προσθετικά υλικά. Οι ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς, όπως οι ασθενείς με AIDS και οι χειρουργημένοι ασθενείς και ιδιαίτερα, αυτοί που χειρουργήθηκαν στον γαστρεντερικό σωλήνα, βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για λοίμωξη από *C. parapsilosis*. Επιπρόσθετα, ασθενείς με παρατεταμένη χρήση κεντρικών φλεβικών καθετήρων ή άλλων ενδαγγειακών συσκευών, όπως είναι οι καρκινοπαθείς, βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης λοίμωξης από *C. parapsilosis*. Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με λευχαιμία και μυκηταιμία, το 20.3% οφειλόταν σε *C. parapsilosis* και σχετίστηκε με την παρουσία κεντρικής φλεβικής γραμμής και με την χρήση ολικής παρεντερικής διατροφής [51]. Σε καρκινοπαθείς με καντινταιμία, η *C. parapsilosis* απομονώθηκε στο 35% περιπτώσεων [52], ενώ σε άλλη μελέτη, μόνο στο 7% [53]. Η παρατεταμένη χρήση ενδοφλέβιου καθετήρα για χορήγηση αντιμικροβιακών σχετίστηκε επίσης με την *C. parapsilosis* [54].

Σε μία πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ισπανία, σε ασθενείς με διηθητική καντιντίαση, απέδειξε ότι οι παράγοντες κινδύνου για διηθητική καντιντίαση είναι οι παρακάτω: αγγειακοί καθετήρες (97%), προηγούμενη

αντιμικροβιακή θεραπεία (91%), ολική παρεντερική διατροφή (54%), προηγούμενο χειρουργείο (46%), προηγούμενη ανοσοκατασταλτική θεραπεία (38%), κακοήθεια (27%), μεταμόσχευση (16%), ουδετεροπενία (12%) και προηγούμενος αποικισμός (11%) [35]. Σε μία άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Βραζιλία, οι παράγοντες της καντινταιμίας από *C. parapsilosis* είναι η ουδετεροπενία, οι κεντρικοί φλεβικοί καθετήρες και η χημειοθεραπεία [55]. Άλλοι παράγοντες κινδύνου αποτελούν οι ενδαγγειακές συσκευές μέτρησης αρτηριακής πίεσης [56], τα οφθαλμικά διαλύματα [47] και η προωρότητα [57].

Η ολική παρεντερική διατροφή συνδέεται με λοίμωξη από *C. parapsilosis*, αφού ο μύκητας αναπτύσσεται εκλεκτικά σε διαλύματα διατροφής με υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη [56]. Επίσης, η ολική παρεντερική διατροφή μπορεί να αυξήσει το βάρος των biofilms κατά 40%, τα οποία είναι ένας σημαντικός λοιμογόνος παράγοντας του παθογόνου [58].

Ο πληθυσμός που βρίσκεται σε μεγαλύτερο κίνδυνο για νοσοκομειακή λοίμωξη από *C. parapsilosis* είναι τα πολύ χαμηλού βάρους νεογνά. Ο αποικισμός της επιδερμίδας ή του γαστρεντερικού σωλήνα είναι συχνά το πρώτο βήμα για την παθογένεση μιας διηθητικής καντιντίασης και τα νεογνά είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στη νόσο, λόγω της μη ακεραιότητας του δέρματος, της ευαισθησίας σε λοίμωξη του γαστρεντερικού, της μακροχρόνιας ανάγκης για κεντρικούς ενδοφλέβιους καθετήρες και της παρατεταμένης ενδοτραχειακής διασωλήνωσης [59]. Η *C. parapsilosis* μπορεί να απομονωθεί στο 1/3 των νεογνών με αποικισμό του γαστρεντερικού σωλήνα από είδη *Candida* [60] και στο 23% από τον στοματοφάρυγγα φυσιολογικών νεογνών [61]. Η κάθετη μετάδοση από την μητέρα στο παιδί καταλήγει στον αποικισμό από είδη *Candida*. Αυτό, ωστόσο, δεν

συμβαίνει με την *C. parapsilosis*, αφού απομονώνεται σπάνια από τον κόλπο, μειώνοντας την έκθεση των νεογνών κατά την διάρκεια του τοκετού [62].

Τα χέρια του ιατρονοσηλευτικού προσωπικού και των άλλων επαγγελματιών υγείας είναι φορείς εξωγενούς απόκτησης *C. parapsilosis*. Ως μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος, η *C. parapsilosis* αποτελεί μία απειλή για τους ασθενείς όταν συναναστρέφονται με αποικισμένους επαγγελματίες υγείας, ειδικά με εκείνους που δεν τηρούν τα πρωτόκολλα της υγιεινής των χεριών. Σε μία μελέτη, το 19% των καλλιιεργειών που πάρθηκαν από τα χέρια των επαγγελματιών υγείας ήταν θετικές στην *C. parapsilosis* [60]. Μοριακές τεχνικές βοηθούν στο να διευκρινίσουν την σχέση ανάμεσα στην φορεία των χεριών με *C. parapsilosis* και την οριζόντια μετάδοση των λοιμώξεων από *C. parapsilosis* σε νοσοκομειακό περιβάλλον, αποδεικνύοντας τις γενετικές ομοιότητες των στελεχών από τα χέρια των επαγγελματιών υγείας με τα κλινικά στελέχη που απομονώθηκαν από τους ασθενείς με μυκητική λοίμωξη [63]. Πρέπει να αναφερθεί, μερικά από τα στελέχη *C. parapsilosis* που απομονώνονται από τα χέρια επαγγελματιών υγείας, είναι γονοτυπικά ίδια με τα στελέχη που προκαλούν μυκητική λοίμωξη που απομονώνονται από τους ασθενείς [64].

Κλινικές εκδηλώσεις

Μυκηταιμία

Η *C. parapsilosis* είναι ένα από τα πιο συχνά είδη *Candida* που προκαλεί διηθητική καντιντίαση παγκοσμίως [65]. Η μυκηταιμία από *C. parapsilosis* μπορεί να οδηγήσει στην διασπορά του μύκητα στους ιστούς [66], προκαλώντας εν τω βάθει λοιμώξεις, με ποσοστό θνητότητας από 4% [67] έως 45% [36,55,68]. Μία

μεταανάλυση έδειξε ότι η μέση θνητότητα για την μυκηταίμια από *C. parapsilosis* είναι 28.5%, ενώ για την μυκηταίμια από *C. albicans* είναι 44.8% [65].

Σε μία μελέτη, που πραγματοποιήθηκε στην Ιταλία από το 1983 έως το 1994, η *C. parapsilosis* ήταν υπεύθυνη για το 25.3% των καντινταιμιών [66], και σε μία άλλη μελέτη, που έλαβε χώρα στην Ισπανία από το 1995 έως το 1999, η *C. parapsilosis* ήταν υπεύθυνη για το 22.4% των καντινταιμιών, ενώ η *C. albicans* για το 44.1% [69]. Σε μία μελέτη που διενεργήθηκε σε ΜΕΘ της Ιταλίας από το 1999 έως το 2003, διαπιστώθηκε μία αύξηση της καντινταιμίας κατά την περίοδο της μελέτης και 40% των καντινταιμιών οφειλόταν στην *C. albicans*, ενώ το 23% στην *C. parapsilosis* [6]. Τέλος, από το 2001 έως το 2003, πραγματοποιήθηκε στην Βραζιλία μία μελέτη, όπου το 23% των καντινταιμιών οφειλόταν στην *C. parapsilosis* και το 38% στην *C. albicans* [55].

Διάγραμμα 2: Ποσοστά των καντινταιμιών από το 1991 έως σήμερα. Η ομάδα «other *Candida species*» περιλαμβάνει τις *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, και *C. rugosa*.

Μία ανάλυση καντινταιμίας που έγινε στην Βαρκελώνη, από το 2002 έως το 2003, απέδειξε ότι η *C. parapsilosis* ευθύνεται για το 23% των περιπτώσεων και το 51% αυτών, σχετιζόταν με ενδοφλέβιους καθετήρες [35]. Κλινικά, οι λοιμώξεις από *C. parapsilosis*, χαρακτηρίζονταν από πυρετό (100%), σηπτικό σοκ (22%), και νεφρική ανεπάρκεια (10%). Τα υποκείμενα νοσήματα περιλάμβαναν την κακοήθεια (27%), την μεταμόσχευση (16%), και τον σακχαρώδη διαβήτη (9%). Συγκριτικά με την *C. albicans*, η *C. parapsilosis* ήταν πιο συχνό αίτιο μυκηταιμίας στα νεογνά (20% vs 4%), σε ασθενείς με ενδοφλέβιες γραμμές ή αγγειακούς καθετήρες, οι οποίοι είχαν λάβει προηγούμενη αντιμυκητική αγωγή (26% vs 7%), σε ασθενείς που ήταν σε παρεντερική διατροφή (54% vs 33%), ή σε μεταμοσχευμένους (16% vs 2%). Η καντινταιμία από *C. albicans*, συνέβαινε πιο συχνά σε ηλικιωμένους (54% vs 27%) και σε διαβητικούς (25% vs 9%).

Σε κάποιες περιπτώσεις, η *C. parapsilosis* ήταν πιο συχνό αίτιο καντινταιμίας, ακόμα και σε σύγκριση με την *C. albicans*, σε ποσοστό 35-45% [39,70,71,72]. Όσον αφορά την νεογνική καντινταιμία, η *C. parapsilosis* θεωρείται η κύρια αιτία της νόσου [65]. Σε μία μεγάλη μελέτη σε ΜΕΘ νεογνών, το 33.7% των καντινταιμιών οφειλόταν στην *C. parapsilosis*, ενώ το 57.9% στην *C. albicans* [37]. Επίσης, σε μία αναφορά που πραγματοποιήθηκε πάλι σε ΜΕΘ νεογνών, υπήρχε μία χαρακτηριστική αύξηση της καντινταιμίας που προκαλείται από *C. parapsilosis* σε αυτόν τον ειδικό πληθυσμό [67].

Η μεγάλη αύξηση των περιστατικών μυκηταιμίας από *C. parapsilosis*, προέρχεται από μολυσματικές πηγές που χρησιμοποιούνται από πολλούς ασθενείς. Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις λοίμωξης από *C. parapsilosis* που οφείλονται σε μολυσμένα διαλύματα διατροφής και αλβουμίνης, καθώς και σε μολυσμένες

ενδαγγειακές συσκευές παρακολούθησης της αρτηριακής πίεσης ή σε μολυσμένα υγρά γλυκερίνης [56,73,74]. Επίσης, ένας σημαντικός παράγοντας πρόκλησης καντινταιμίας από *C. parapsilosis*, είναι η οριζόντια μετάδοση του μύκητα από τα χέρια των επαγγελματιών υγείας στους ασθενείς. Τέλος, η *C. parapsilosis* ευθύνεται περίπου για το 32.9% όλων των καντινταιμιών που συμβαίνουν στο νοσοκομείο και τη ΜΕΘ νεογνών, ενώ η *C. albicans* για το 51.1%. Ωστόσο, το ποσοστό της λοίμωξης από *C. parapsilosis* αυξάνεται συνεχώς, ενώ η επίπτωση της λοίμωξης από *C. albicans* παραμένει σταθερή τα τελευταία χρόνια [75].

Ενδοκαρδίτιδα

Η μυκητική ενδοκαρδίτιδα υπολογίζεται στο 1.3-6% όλων των περιπτώσεων λοιμώδους ενδοκαρδίτιδας και η επίπτωσή της έχει αυξηθεί τις τελευταίες δύο δεκαετίες, ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης της διάγνωσης, που οφείλεται στις καλύτερες μεθόδους καλλιέργειας, στην χρήση του διοισοφάγειου υπερηχογραφήματος, στην αύξηση της διαθεσιμότητας ιατρικών θεραπειών που προδιαθέτει τους ασθενείς στις μυκητικές λοιμώξεις [76]. Τα είδη *Candida* ευθύνονται για το 94.1% των περιπτώσεων μυκητικής ενδοκαρδίτιδας, πολλά από τα οποία αναπτύσσονται μετά από καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις, και η *C. parapsilosis* συνδέεται με το 17% των παραπάνω περιπτώσεων, αποτελώντας το δεύτερο πιο συχνό είδος μετά την *C. albicans* [76]. Οι κύριοι προδιαθεσικοί παράγοντες για την ενδοκαρδίτιδα από *C. parapsilosis* περιλαμβάνουν τις προσθετικές βαλβίδες, την ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών, την ενδοφλέβια παρεντερική διατροφή, το προηγούμενο χειρουργείο κοιλιάς, την ανοσοκαταστολή, την θεραπεία με ευρέως φάσματος αντιμικροβιακά και την προηγούμενη

βαλβιδοπάθεια [76]. Η θνητότητα κυμαίνεται από 41.7-65%. Η παθογένεια της *C. parapsilosis* στην ενδοκαρδίτιδα γίνεται μέσω του σχηματισμού biofilms στις προσθετικές βαλβίδες και γι'αυτό, συνιστάται ο συνδυασμός αντιμυκητικής θεραπείας και χειρουργείου για την καλύτερη έκβαση των ασθενών [65,76].

Μηνιγγίτιδα

Η μυκητική μηνιγγίτιδα είναι μία πολύ σοβαρή και απειλητική για τη ζωή νόσο που μπορεί να προκληθεί από διάφορα είδη μυκήτων. Τα κλασσικά συμπτώματα είναι κεφαλαλγία, φωτοφοβία, αυχενική δυσκαμψία, πυρετός και σύγχυση. Η *C. parapsilosis* είναι μία σπάνια αιτία μυκητικής μηνιγγίτιδας (1.6%), με μεγαλύτερη και αυξανόμενη όμως, επίπτωση στα νεογνά (23.1%). Αυτή η αύξηση της επίπτωσης στα νεογνά, επιβάλλει την εγρήγορση όλων των ιατρών για το συγκεκριμένο είδος μηνιγγίτιδας, με σκοπό την έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία και την μείωση της νοσηρότητας και θνητότητας που σχετίζεται με τη νόσο [65,77].

Περιτονίτιδα

Η μυκητική περιτονίτιδα χαρακτηρίζεται από σοβαρή νοσηρότητα και υψηλή θνητότητα, περίπου 44%. Συνήθως, συμβαίνει σε ασθενείς με τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια που κάνουν θεραπεία με συνεχή νοσοκομειακή περιτοναϊκή διάλυση [78]. Οι κυριότεροι προδιαθεσικοί παράγοντες είναι η προηγούμενη θεραπεία με αντιμικροβιακά για βακτηριακή περιτονίτιδα, η οποία επάγει την μυκητική υπερανάπτυξη. Χαρακτηρίζεται από θολό υγρό διάλυσης, κοιλιακό άλγος, πυρετό και απόφραξη εντέρου [78]. Αν και η *C. albicans* θεωρείται το πιο συχνό είδος *Candida* που προκαλεί περιτονίτιδα, πολλές μελέτες δείχνουν ότι

η *C. parapsilosis* είναι ένα αναδυόμενο είδος που αυξάνεται συνεχώς σε ασθενείς που κάνουν περιτοναϊκή διάλυση, σε ενήλικες και ιδιαίτερα σε παιδιά, με μεγάλο ποσοστό επιπλοκών, όπως σχηματισμός αποστήματος και μακροχρόνια περιτονίτιδα [65,78,79]. Αφαίρεση του καθετήρα και επιθετική συστηματική θεραπεία με αντιμυκητικά είναι απαραίτητα για την αντιμετώπιση της περιτονίτιδας από *C. parapsilosis* [79].

Αρθρίτιδα

Η μυκητική αρθρίτιδα είναι πολύ σπάνια και συνήθως, συνδέεται με είδη *Candida*. Η πλειονότητα των περιπτώσεων οφείλεται σε άμεση προσβολή των αρθρώσεων, ιδιαίτερα σε ηλικιωμένους, ενώ σπάνια μπορεί να είναι αποτέλεσμα επιπλοκής της διάχυτης καντιντίασης, ειδικά σε ανοσοκατεσταλμένους, και σε αυτή την περίπτωση, η πρόγνωση είναι χειρότερη [80]. Οι περισσότερες περιπτώσεις μυκητικής αρθρίτιδας από *C. parapsilosis* έχουν περιγραφεί σε ασθενείς που φέρουν προσθετικές αρθρώσεις ή έχουν υποβληθεί σε επεμβατικές μεθόδους, όπως η αρθροκέντηση [56]. Είναι πολύ δύσκολο να θεραπευτεί λόγω των συχνών υποτροπών. Η αφαίρεση της πρόσθεσης σε συνδυασμό με τοπική και συστηματική χορήγηση αντιμυκητικών είναι ένας καλός τρόπος αντιμετώπισης [56,65].

Οφθαλμικές λοιμώξεις

Η *C. parapsilosis* συνδέεται με διηθητικές οφθαλμικές παθήσεις, όπως ενδοφθαλμίτιδα (ιδιαίτερα μετεγχειρητική λοίμωξη) και κερατίτιδα [65]. Συνήθως εμφανίζεται μετά από χειρουργείο καταρράκτη, μετά από χρήση σταγόνων με κορτικοστεροειδή, και μετά από εμφύτευση ενδοφθάλμιου φακού [81]. Η

ενδογενής μυκητική ενδοφθαλμίτιδα είναι σπάνια και η συχνότητά της είναι ελάχιστη, λόγω της έγκαιρης μικροβιολογικής ταυτοποίησης και διάγνωσης της συστηματικής μυκητικής λοίμωξης, καθώς και της επιθετικής και λιγότερο τοξικής αντιμυκητικής αγωγής [82]. Χαρακτηρίζεται από συχνές υποτροπές και η θεραπεία συνιστάται στην αφαίρεση του εμφυτεύσιμου φακού, στον χειρουργικό καθαρισμό και στην τοπική, συστηματική ή ενδοφθάλμια χορήγηση αντιμυκητικών παραγόντων [65,81].

Ωτομύκωση

Η ωτομύκωση είναι μία σχετικά σπάνια λοίμωξη που προκαλεί μέση ή εξωτερική ωτίτιδα. Έχει αναφερθεί ότι οι ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς με χρόνια υπερπλαστική φλεγμονή είναι πιο επιρρεπείς στην λοίμωξη από παθογόνο μύκητα, και ιδιαίτερα, *C. albicans* και *C. parapsilosis*, καθώς η αυξημένη παραγωγή βλέννης προάγει τον αποικισμό [83]. Οι παράγοντες κινδύνου είναι βουτιές στην θάλασσα, τραυματισμός και προηγούμενη χορήγηση αντιμικροβιακών παραγόντων, και ιδιαίτερα κινολόνης [83]. Η θεραπεία περιλαμβάνει χειρουργικό καθαρισμό και από του στόματος ή τοπική αντιμυκητική αγωγή [83].

Ονυχομυκητίαση

Η ονυχομυκητίαση μπορεί να προκληθεί από διάφορα είδη μυκήτων, με τα πιο συχνά τα δερματόφυτα και τα είδη *Candida* και παρατηρείται κυρίως σε άτομα ηλικίας >50 ετών. Η *C. parapsilosis* αποτελεί το δεύτερο πιο συχνό αίτιο μετά το δερματόφυτο *Trichophyton rubrum*. Οι παράγοντες κινδύνου είναι ο

προηγούμενος τραυματισμός του νυχιού και η επαφή με το χώμα [84]. Τοπική αντιμυκητική αγωγή είναι επαρκής για την αντιμετώπιση της νόσου.

Αιδοιοκολπίτιδα

Η *C. parapsilosis* είναι μία πολύ σπάνια αιτία μυκητικής λοίμωξης, αν και η συχνότητα των non-*albicans* ειδών αυξάνεται τα τελευταία χρόνια, λόγω της ευρείας χρήσης τοπικών και από του στόματος των αζολών [47]. Η *C. parapsilosis* και η *C. albicans* που σχετίζονται με την αιδοιοκολπίτιδα παράγουν μεγαλύτερα ποσά ασπαρτικών πρωτεΐναισών που υδρολύουν την ανοσοσφαιρίνη Α του βλεννογόνου, η οποία αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό φραγμό κατά της λοίμωξης. Περίπου 20% των ασθενών, από τους οποίους απομονώνεται *Candida* είναι ασυμπτωματικοί και αποικισμένοι. Η χορήγηση αντιμυκητικών παραγόντων είναι η κύρια αντιμετώπιση της λοίμωξης [65].

Λοίμωξη ουροποιητικού

Η παρουσία *Candida* στα ούρα δεν αποτελεί απαραίτητα διάχυτη καντιντίαση, αλλά μπορεί να είναι το αποτέλεσμα αποικισμού του κατώτερου ουροποιητικού συστήματος. Η *C. parapsilosis* δεν είναι μία συχνή αιτία ουρολοίμωξης, αποτελώντας το τέταρτο πιο συχνό είδος *Candida*, μετά τις *C. albicans*, *C. tropicalis* και *C. glabrata* [85].

Παθογένεια

Λίγα είναι γνωστά για την παθογένεια της *C. parapsilosis*. Η παθογένεια της διηθητικής καντιντίασης διευκολύνεται από ποικίλους λοιμογόνους παράγοντες, όπως η προσκόλληση στα κύτταρα του ξενιστή, ο σχηματισμός biofilms και η έκκριση υδρολυτικών ενζύμων (πρωτεάσες, φωσφολιπάσες και λιπάσες).

Προσκόλληση

Ο αποικισμός και η λοίμωξη με *C. parapsilosis* εξαρτώνται από την ικανότητα του μύκητα να προσκολλάται στα κύτταρα και στους ιστούς του ξενιστή, ειδικά στους βλεννογόνους. Η προσκόλληση στις ενδαγγειακές συσκευές διευκολύνει την δημιουργία biofilms και προάγει την βλάβη του ξενιστή. Η υδροφοβικότητα της κυτταρικής επιφάνειας έχει συνδεθεί με την αρχική προσκόλληση της *C. parapsilosis* και η παραγωγή βλέννης έχει συνδεθεί με την τάση της *C. parapsilosis* να προσκολλάται στους πλαστικούς καθετήρες [86].

Η *C. parapsilosis* παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα για προσκόλληση στα επιθηλιακά κύτταρα της παρειάς, σε σχέση με την *C. albicans*, και ειδικότερα, τα επιφανειακά στελέχη προσκολλώνται περισσότερο στα επιθηλιακά κύτταρα σε σχέση με τα συστηματικά στελέχη [87]. Επίσης, η *C. parapsilosis* παρουσιάζει μία μεγαλύτερη ικανότητα να προσκολλάται σε πλαστικό υλικό, σε σχέση με άλλα είδη *Candida*, αποτελώντας έναν παράγοντα για συστηματική λοίμωξη *in vivo* [87].

Σχηματισμός biofilms

Τα biofilms είναι ένα σύνολο μικροοργανισμών που συνδέονται στην επιφάνεια μέσα στο εξωκυττάριο δίκτυο και είναι ο πιο συχνός τύπος μικροβιακής

ανάπτυξης [88]. Η *C. parapsilosis* παράγει λιγότερα ποσά biofilms και λιγότερο πολύπλοκα όσον αφορά την δομή, σε σχέση με άλλα είδη [89]. Ορισμένοι φαινότυποι της *C. parapsilosis* που σχηματίζουν ψευδοϕέες, παράγουν περισσότερα ποσά biofilms και παρουσιάζουν μεγαλύτερη διήθηση στο άγαρ και ισχυρότερη λοιμογόνο δύναμη, σε σχέση με τα στελέχη που είναι σε μορφή βλαστοσπορίων [90]. Ο σχηματισμός των biofilms επάγεται από την προσκόλληση του μύκητα στους ιστούς ή σε ιατρικές συσκευές, όπως σε κεντρικούς και περιφερικούς φλεβικούς καθετήρες, καθετήρες αιμοδιάλυσης και περιτοναϊκής διάλυσης, ενδοκαρδιακές προσθετικές συσκευές και προσθετικές αρθρώσεις, και στην συνέχεια, μεταβάλλεται η μορφολογία και η συμπεριφορά του μικροοργανισμού [91].

Ο σχηματισμός των biofilms είναι ένας ισχυρός λοιμογόνος παράγοντας για πολλά είδη *Candida*, καθώς προκαλεί σημαντική αντοχή στα αντιμυκητικά, περιορίζοντας την διείσδυση των φαρμάκων και προστατεύοντας τα κύτταρα από την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή. Η *C. parapsilosis* που παράγει biofilms συνδέεται με μεγάλες επιδημίες και με μεγαλύτερη θνητότητα σε σχέση με αυτή που δεν παράγει biofilms [65,92]. Η ικανότητα κάποιων στελεχών *C. parapsilosis* να προκαλούν νόσο σε ποικίλους ιστούς επηρεάζεται από την ικανότητά τους να σχηματίζουν biofilms. Επομένως, τα στελέχη που απομονώνονται από το αίμα είναι πιο ικανά να σχηματίζουν biofilms, σε σχέση με αυτά που απομονώνονται από άλλα μέρη του σώματος [93].

Έχει αναφερθεί αντοχή στους αντιμυκητικούς παράγοντες των ειδών *Candida* που σχηματίζουν biofilms, όπως στην αμφοτερικίνη Β και στις αζόλες. Ωστόσο, οι εχινοκανδίνες και η λιποσωμιακή αμφοτερικίνη Β αναστέλλουν τις

μεταβολικές δραστηριότητες της *C. parapsilosis* και είναι δραστικοί παράγοντες κατά των biofilms [88]. Νέα φάρμακα με δράση κατά των biofilms πρέπει να ερευνηθούν, ώστε να αντιμετωπίζονται οι λοιμώξεις αυτές αποτελεσματικά, χωρίς να περιορίζονται οι επεμβατικές μέθοδοι σε κάποιες καταστάσεις, όπως στην ενδοκαρδίτιδα και την αρθρίτιδα [65,88].

Έκκριση ενζύμων

Η έκκριση των ασπαρτικών πρωτεϊνών διευκολύνει την διείσδυση και τον αποικισμό των ιστών του ξενιστή, διαταράσσοντας τις μεμβράνες του βλεννογόνου και μειώνοντας ανοσολογικές και δομικές πρωτεΐνες άμυνας, όπως είναι η ανοσοσφαιρίνη G, η α2 μακροσφαιρίνη, η πρωτεΐνη C3, η β-λακτοσφαιρίνη, η λακτοϋπεροξειδάση, το κολλαγόνο και η φμπρονεκτίνη [94,95]. Τα στελέχη της *C. parapsilosis* που απομονώνονται από το αίμα παράγουν λιγότερες ασπαρτικές πρωτεΐνες σε σύγκριση με τα στελέχη που απομονώνονται από πιο εντοπισμένες λοιμώξεις, όπως από τον κόλπο και το δέρμα. Επίσης, η *C. parapsilosis* παρουσιάζει μειωμένη παραγωγή και δραστικότητα των ασπαρτικών πρωτεϊνών, σε σχέση με την *C. albicans* [96]. Οι ασπαρτικές πρωτεΐνες αποτελούν έναν ουσιώδη στόχο για την ανάπτυξη φαρμάκων, όπως για παράδειγμα οι αναστολείς των ασπαρτικών πρωτεϊνών, που θα εμποδίζουν την διείσδυση του μύκητα και θα μειώνουν την ιστοπαθολογική καταστροφή κατά την διάρκεια της λοίμωξης [97].

Οι φωσφολιπάσες είναι ένζυμα που υδρολύουν τους εστερικούς συνδέσμους στα γλυκεροφωσφολιπίδια [65]. Πιθανόν, συμμετέχουν στην καταστροφή των μεμβρανών του βλεννογόνου και επηρεάζουν την προσκόλληση στα επιθηλιακά κύτταρα, την διείσδυση του μύκητα στον ξενιστή, παρά την άμυνα

του ξενιστή, αποτελώντας έναν ισχυρό λοιμογόνο παράγοντα σε μοντέλα ποντικών με διάχυτη καντιντίαση [98]. Ο ρόλος τους στην παθογένεση της *C. parapsilosis* δεν είναι ακόμα καλά κατανοητός [65].

Οι λιπάσες είναι ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση και την σύνθεση των τριακυλογλυκερολών και χαρακτηρίζονται από την σταθερότητά τους σε υψηλές θερμοκρασίες και σε οργανικούς διαλύτες και από αντίσταση στην πρωτεόλυση [65]. Βοηθούν την προσκόλληση του μύκητα στα κύτταρα και τους ιστούς του ξενιστή, παρουσιάζουν συνέργεια με άλλα ένζυμα, διευκολύνουν την πέψη των λιπιδίων για την θρέψη, υδρολύουν χάρη στις φωσφολιπολυτικές ιδιότητές τους, και συμμετέχουν στην φλεγμονώδη απάντηση, επηρεάζοντας τα ανοσιακά κύτταρα και την άμυνα του ξενιστή, καταστρέφοντάς την. Υπάρχουν δύο γονίδια που κωδικοποιούν τις λιπάσες στην *C. parapsilosis* [99]. Οι αναστολείς της λιπάσης μειώνουν σημαντικά την βλάβη των ιστών κατά την διάρκεια της λοίμωξης και επομένως, μπορεί να είναι σημαντικά σημεία για την ανάπτυξη αντιμυκητικών φαρμάκων, και ιδιαίτερα σε ασθενείς που λαμβάνουν διαλύματα λιπιδίων, όπως τα χαμηλού βάρους νεογνά που λαμβάνουν ολική παρεντερική διατροφή πλούσια σε λίπη [65,100].

Ευαισθησία στα αντιμυκητικά φάρμακα

Δεν υπάρχει ομοφωνία σχετικά με την θεραπεία της διηθητικής καντιντίασης από *C. parapsilosis*, αν και η αφαίρεση οποιουδήποτε ξένου σώματος και η χορήγηση συστηματικής αντιμυκητικής αγωγής θεωρείται μία τυπική θεραπευτική προσέγγιση [65]. Η αμφοτερικίνη Β έχει υπάρξει το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο αντιμυκητικό, αλλά λόγω των συχνών της επιπλοκών, όπως η

νεφροτοξικότητα, οδήγησε στην μείωση της δόσης ή σε διακοπή της θεραπείας και ταυτόχρονα, στην ανάπτυξη της λιποσωμιακής μορφής της αμφοτερικίνης Β, που χαρακτηρίζεται από παρόμοια αποτελεσματικότητα και μειωμένη νεφροτοξικότητα [101,102]. Η *in vitro* αντοχή της *C. parapsilosis* στην αμφοτερικίνη Β κυμαίνεται στο 2-3% και οι μέσες τιμές των MIC₅₀ και MIC₉₀ κυμαίνονται από 0.13 έως 1μg/ml και από 0.5 έως 1μg/ml, αντίστοιχα [103]. Αν και η αντοχή αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα για την χρήση της αμφοτερικίνης Β κατά της *C. parapsilosis*, η χαμηλή υδατοδιαλυτότητά της και η υψηλή τοξικότητά της αποτελούν δύο σπουδαία μειονεκτήματα για την επιλογή της ως θεραπεία [104].

Η φλουконаζόλη θεωρείται το πιο συχνά χορηγούμενο φάρμακο εναλλακτικά της αμφοτερικίνης Β. Έχει αναφερθεί *in vitro* αντοχή στην φλουконаζόλη σε διάφορα non-*C. albicans* είδη, υποστηρίζοντας την άποψη ότι η ευρεία χρήση της φλουконаζόλης έχει οδηγήσει σε αύξηση των καντινταιμιών που προκαλούνται από διάφορα non- *C. albicans* είδη [65]. Επίσης, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις κλινικής αντοχής στην *C. parapsilosis* [92]. Η *in vitro* αντοχή της *C. parapsilosis* στην φλουконаζόλη κυμαίνεται στο 0-4.6% και οι μέσες τιμές των MIC₅₀ και MIC₉₀ κυμαίνονται από 0.5 έως 1μg/ml και από 1 έως 2μg/ml, αντίστοιχα [103]. Αν και η μεγάλης διάρκειας χορήγηση φλουконаζόλης στον έλεγχο των καντινταιμιών από *C. parapsilosis* έχει συνδεθεί με αυξημένη συχνότητα λοιμώξεων από στελέχη ανθεκτικά στην φλουконаζόλη, στα πρόωρα νεογνά με πολύ χαμηλό βάρος γέννησης (<1000g ή <27 εβδομάδων) συνιστάται η προφύλαξη τους από λοιμώξεις, που προκαλούνται από *C. parapsilosis*, με χορήγηση αζολών και πιο συγκεκριμένα, με φλουконаζόλη [105].

Όσον αφορά τα άλλα είδη αζολών, έχει αναφερθεί ότι η *C. parapsilosis* παρουσιάζει αντοχή στην ιτρακοναζόλη σε ποσοστό 1.5-4%, ενώ η αντοχή στην βορικοναζόλη είναι πολύ σπάνια [103]. Ωστόσο, 1.9% των στελεχών *C. parapsilosis* είναι ανθεκτικά *in vitro* στην βορικοναζόλη, λόγω της διασταυρούμενης αντοχής στις αζόλες, αφού τα στελέχη αυτά παρουσίαζαν αντοχή συγχρόνως, και στην φλουκοναζόλη [49].

Η φλουκυτοσίνη χορηγείται πάντα σε συνδυασμό με την αμφοτερικίνη Β ή τις αζόλες, ιδιαίτερα στην καντιντιασική μηνιγγίτιδα. Η μονοθεραπεία αντενδείκνυται, λόγω του αυξημένου κινδύνου για αντοχή, όπως στην μεγάλης διάρκειας θεραπεία για ενδοκαρδίτιδα [65,106]. Η *in vitro* αντοχή της *C. parapsilosis* στην φλουκυτοσίνη κυμαίνεται στο 23%, ενώ πρόσφατα, έχει αναφερθεί στο 2-6.4% [103].

Οι εχινοκανδίνες αποτελούν τη νεότερη κατηγορία αντιμυκητικών φαρμάκων και περιλαμβάνουν την κασποφουγκίνη, την μικαφουγκίνη και την ανιντουλαφουγκίνη [65]. Αναστέλλουν την σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και την συνθετάση της (1,3)-β-D-γλυκάνης, ένα ένζυμο που σχηματίζει τα πολυμερή της γλυκάνης, ενός κύριου συστατικού του κυτταρικού τοιχώματος [65]. Η κασποφουγκίνη είναι αρκετά αποτελεσματική και με μικρή τοξικότητα θεραπεία διηθητικής καντιντίασης, που προκαλείται από διάφορα είδη *Candida*, συμπεριλαμβανομένης και της *C. parapsilosis* [9].

Οι μέσες τιμές των MIC₅₀ και MIC₉₀ της κασποφουγκίνης είναι υψηλότερες για την *C. parapsilosis* απ' ό τι για άλλα είδη *Candida* και κυμαίνονται από 0.85 έως 2μg/ml και από 2 έως 2.33μg/ml, αντίστοιχα [103]. Αν και η αιτιολογία της αντοχής στην κασποφουγκίνη δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητή, δομικές

διαφορές στην σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος, μία μειωμένη συγγένεια με το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα της συνθετάσης της γλυκάνης ή διαφορές στο ρυθμιστικό σύστημα μπορεί να είναι υπεύθυνοι μηχανισμοί αντοχής [107]. Οι μέσες τιμές των MIC₅₀ και MIC₉₀ της μικαφουγκίνης για την *C. parapsilosis* είναι 1μg/ml και ≥2μg/ml, αντίστοιχα, ενώ για την ανιντουλαφουγκίνη, οι μέσες τιμές των MIC₅₀ και MIC₉₀ είναι 2μg/ml και ≥2μg/ml, αντίστοιχα [103]. Παρόλο τις υψηλές MIC, οι εχινοκανδίνες διατηρούν την *in vitro* και *in vivo* δραστηριότητά τους έναντι της *C. parapsilosis*, και ειδικά σε στελέχη που είναι ανθεκτικά στην αμφοτερικίνη Β, την φλουκυτοσίνη και τις αζόλες [88].

Οι εχινοκανδίνες μπορεί να αποτύχουν ως θεραπεία καντινταιμίας από *C. parapsilosis*, όπου τα MICs για τις εχινοκανδίνες είναι πολύ χαμηλά (0.25μg/ml) [108]. Επίσης, έχουν αναφερθεί breakthrough λοιμώξεις από *C. parapsilosis*, σε άτομα που λάμβαναν προηγουμένως θεραπεία με κασποφουγκίνη [109]. Στην πραγματικότητα, σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τα MICs για τις εχινοκανδίνες, αυτά τα φάρμακα μπορούν να προάγουν την παράδοξη ανάπτυξη *in vitro* μερικών στελεχών *C. parapsilosis* και άλλων ειδών *Candida* [110]. Επιπρόσθετα, πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες απέδειξαν μία συσχέτιση ανάμεσα στην αυξημένη χρήση της κασποφουγκίνης και στην αυξημένη επίπτωση της καντινταιμίας από *C. parapsilosis* [111]. Γι' αυτόν τον λόγο, οι εχινοκανδίνες πρέπει να χορηγούνται με προσοχή κατά την διάρκεια διηθητικής νόσου από *C. parapsilosis*.

Συμπέρασμα

Επομένως, η *C. parapsilosis* αποτελεί ένα σημαντικό non-*albicans* είδος *Candida* που ολοένα αυξάνεται παγκοσμίως και ταυτόχρονα, αυξάνεται η επίπτωση

των λοιμώξεων που προκαλούνται από αυτό το είδος. Οι πρόοδοι στην φροντίδα υγείας θα επιτρέψουν τα υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε νεογνά και σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, ενώ η αυξημένη χρήση των ανοσοτροποποιητικών φαρμάκων θα οδηγήσει στην αύξηση των λοιμώξεων από *C. parapsilosis*. Αυτό το παθογόνο έχει σχέση με την παρεντερική διατροφή, συχνά αποικίζει τα χέρια των επαγγελματιών υγείας και σχηματίζει biofilms σε προσθετικά υλικά και κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες. Λόγω της αυξημένης επίπτωσης και της υψηλής νοσηρότητας και θνητότητας που σχετίζονται με την *C. parapsilosis*, είναι απαραίτητο να γίνουν περισσότερες μελέτες για την επιδημιολογία, την μικροβιολογία, την γενετική και την αντιμυκητική ευαισθησία του είδους αυτού, καθώς και να ανακαλυφθούν περισσότερες αποτελεσματικές θεραπευτικές επιλογές. Επιπλέον γενετικές μελέτες πρέπει να διενεργηθούν, ώστε να αναγνωρισθούν οι λοιμογόνοι παράγοντες της *C. parapsilosis* και να στοχοποιηθούν από αντιμικροβιακούς παράγοντες για τον άμεσο έλεγχο της νόσου [65].

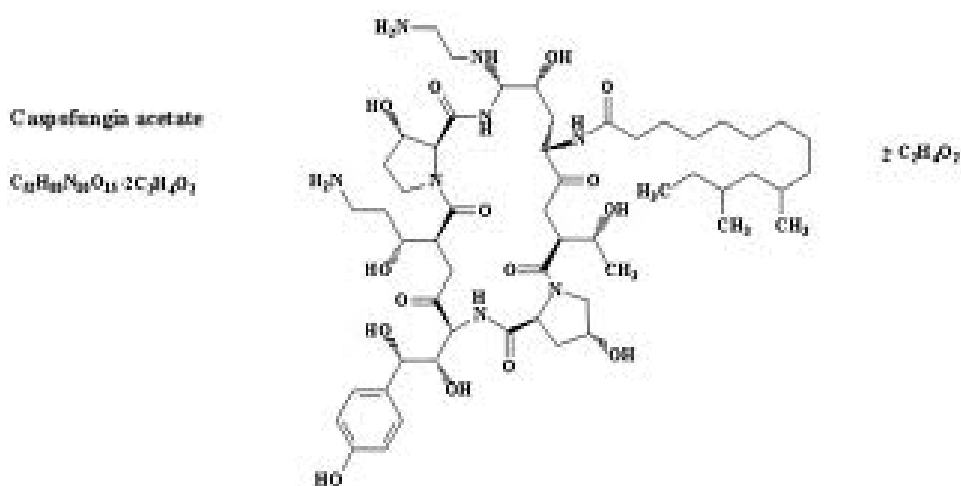
Γ. Εχινοκανδίνες: τα νεότερα αντιμυκητικά φάρμακα

Γενικά

Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιμυκητικά φάρμακα έχουν ως στόχο την εργοστερόλη, την στερόλη των μεμβρανών του μύκητα και είναι είτε μυκητοκτόνα, αλλά τοξικά για τον ξενιστή (πολυένια), είτε μυκητοστατικά και πιο επιρρεπή στην αντοχή (αζόλες και τριαζόλες) [112]. Η νεότερη κατηγορία αντιμυκητικών παραγόντων είναι οι εχινοκανδίνες, οι οποίες αναστέλλουν την βιοσύνθεση της β-1,3-D-γλυκάνης, ένα συστατικό-κλειδί του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα, οδηγώντας τον σε ωσμωτική αστάθεια και σε λύση [113,114]. Αυτά τα φάρμακα είναι ευρέως φάσματος αντιμυκητικά και είναι δραστικά κατά της *Candida* και του *Aspergillus*, χωρίς να παρουσιάζουν διασταυρούμενη αντοχή με άλλους αντιμυκητικούς παράγοντες και ως εκ τούτου, είναι αποτελεσματικά κατά των μυκήτων που είναι ανθεκτικοί στις αζόλες [113]. Είναι μυκητοκτόνα κατά της *Candida* και μυκητοστατικά κατά του *Aspergillus*, όπου προκαλούν μορφολογικές αλλοιώσεις και δομική βλάβη, εμποδίζοντας την ανάπτυξη των υφών [115]. Επίσης, είναι αποτελεσματικά κατά των ειδών που παράγουν biofilms, όπως η *C. parapsilosis*, αλλά δεν έχουν δραστηριότητα κατά των *Zygomycetes*, *Cryptococcus neoformans* και *Fusarium spp.* [113].

Η κασποφουγκίνη, το πρώτο μέλος της κατηγορίας, έλαβε έγκριση από το FDA για την θεραπεία σοβαρών καντιντιάσεων, το 2002, ακολούθησε η μिकाφουγκίνη το 2005 και τέλος, η ανιντουλαφουγκίνη το 2006 [112,113]. Πιο συγκεκριμένα, η κασποφουγκίνη και η ανιντουλαφουγκίνη χορηγούνται για την θεραπεία της οισοφαγικής καντιντιάσης, της καντινταιμίας και άλλων λοιμώξεων από *Candida*. Η κασποφουγκίνη επίσης έχει εγκριθεί για την εμπειρική θεραπεία

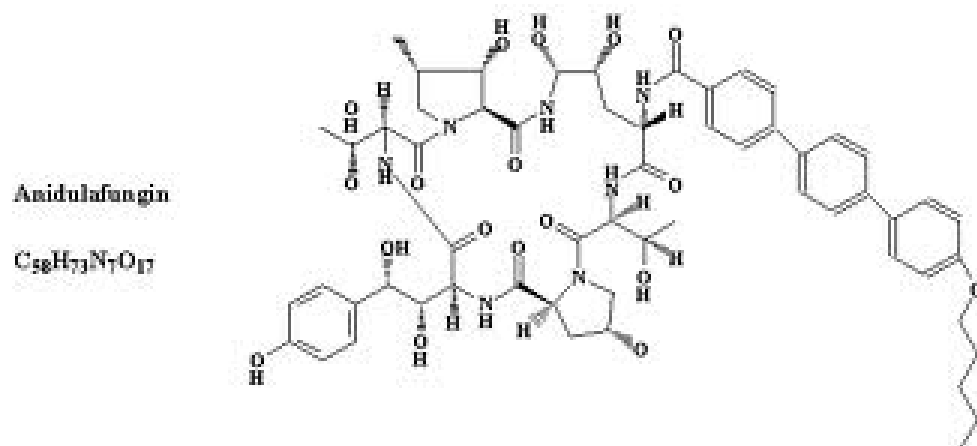
πιθανών μυκητιάσεων σε ασθενείς με εμπύρετη ουδετεροπενία, καθώς και για την θεραπεία λοιμώξεων από *Aspergillus*, σε ασθενείς που απέτυχαν οι πρώτης γραμμής θεραπευτικές επιλογές [116]. Η μικαφουγκίνη έχει εγκριθεί για την θεραπεία της οισοφαγικής καντιντίασης και για την προφύλαξη ουδετεροπενικών ασθενών από καντιντίαση, που υποβάλλονται σε μεταμόσχευση αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων [116]. Γενικά, οι εχινοκανδίνες παρουσιάζουν άριστη ασφάλεια και ανεκτικότητα με πολύ λίγες παρενέργειες που σχετίζονται με την ουσία [116]. Οι μοριακές δομές της κασποφουγκίνης και της αντιντουλαφουγκίνης φαίνονται στις εικόνες 3 και 4.



Εικόνα 3: Μοριακή δομή της κασποφουγκίνης (παράγωγο της πνευμοκανδίνης Β)

Η κλινική αντοχή είναι σχετικά σπάνια και έχουν αναφερθεί λίγες μόνο σποραδικές περιπτώσεις επιλοίμωξης (breakthrough λοιμώξεις) από μύκητες σε ασθενείς που ελάμβαναν θεραπεία με εχινοκανδίνες. Η παρουσία στελεχών από είδη που είναι ευαίσθητα στις εχινοκανδίνες που παραδόξως εμφανίζουν πολύ υψηλές τιμές MIC, καθώς και η παρουσία λιγότερο ευαίσθητων non-*albicans Candida spp.*, όπως η *C.*

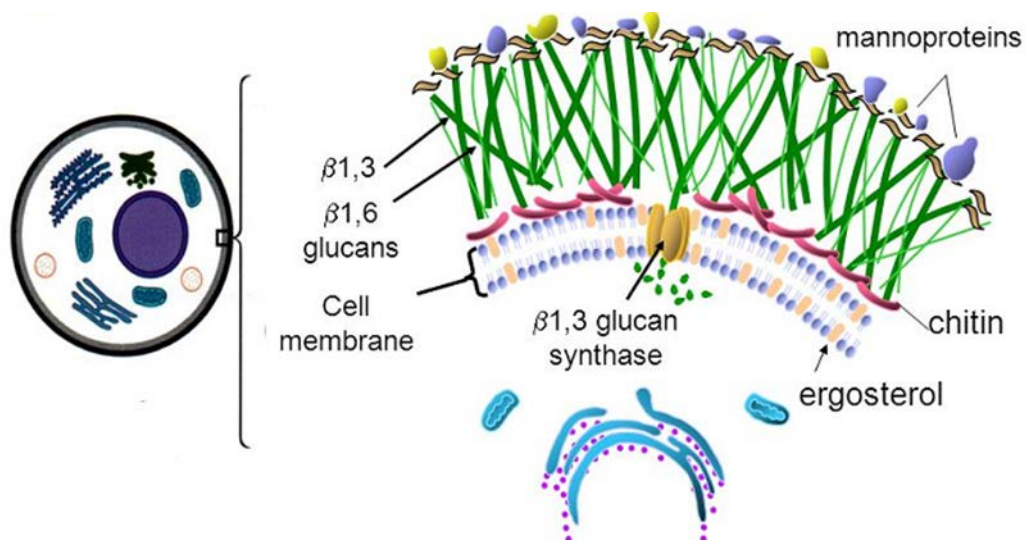
parapsilosis και η *C. guilliermondii*, τα οποία παρουσιάζουν τιμές MIC 4-100 φορές μεγαλύτερες σε σχέση με αυτές της *C. albicans*, αποτελούν δύο σημαντικά ευρήματα για την κλινική έκβαση, αφού αυτοί οι οργανισμοί ανταποκρίνονται στην θεραπεία με εχινοκανδίνες [117-119]. Ωστόσο, καθώς η έκθεση των ασθενών στις εχινοκανδίνες αυξάνεται, αναμένεται και ο αριθμός των στελεχών με αυξημένες τιμές MIC *in vitro* και με μειωμένη ευαισθησία στις εχινοκανδίνες να αυξηθεί, και ταυτόχρονα να αυξηθεί ο αριθμός των ασθενών με κλινική αποτυχία, λόγω της αντοχής στις εχινοκανδίνες. Δυστυχώς, η σχέση ανάμεσα στην μειωμένη *in vitro* ευαισθησία στις εχινοκανδίνες και στην κλινική αποτυχία είναι ασαφής, αφού οι υψηλές τιμές MIC δεν αποτελούν πάντα έναν αξιόπιστο δείκτη της έκβασης της θεραπείας [120,121].



Εικόνα 4: Μοριακή δομή της ανιτουλαφουγκίνης

Σύμπλεγμα συνθετάσης της γλυκάνης

Η συνθετάση της γλυκάνης είναι ένα ενζυμικό σύμπλεγμα με πολλαπλές υπομονάδες, η οποία βρίσκεται στην πλασματοκυτταρική μεμβράνη και παράγει τον πολυσακχαρίτη, β -1,3-D-γλυκάνη. Είναι υπεύθυνη για την κατασκευή του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα. Το ενζυμικό σύμπλεγμα αποτελείται τουλάχιστον από δύο υπομονάδες, την Fks1 και την Rho. Η Fks1 φαίνεται να αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα, η οποία έχει συγγένεια ανάλογη του υποστρώματος της UDP-γλυκόζης [122]. Η Rho, μία πρωτεΐνη που συνδέεται με το GTP, βοηθά στην ρύθμιση της δραστηριότητας της συνθετάσης της γλυκάνης [123]. Η φύση του μηχανισμού της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις εχινοκανδίνες και στην συνθετάση της γλυκάνης παραμένει ακόμα ασαφής. Στην εικόνα 5, φαίνεται το κυτταρικό τοίχωμα του μύκητα και η λειτουργία της συνθετάσης της γλυκάνης.



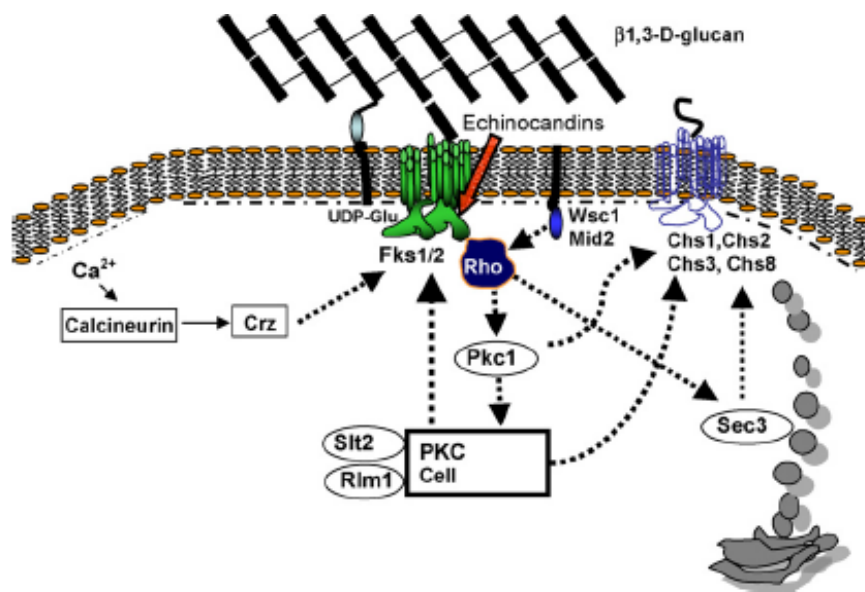
Εικόνα 5: Το κυτταρικό τοίχωμα του μύκητα και η λειτουργία της συνθετάσης της γλυκάνης.

Ο ρόλος της βιοσύνθεσης και της ακεραιότητας του κυτταρικού τοιχώματος στην αποτελεσματικότητα του φαρμάκου

Η διατήρηση της ακεραιότητας του κυτταρικού τοιχώματος είναι ουσιώδης, αφού οι μύκητες δεν μπορούν να επιβιώσουν χωρίς την συγκεκριμένη δομή ή σε περίπτωση που αναστέλλεται κάποια οδός. Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από την εξωτερική στοιβάδα που περιέχει γλυκοπρωτεΐνες και από την εσωτερική στοιβάδα που περιέχει πολυμερή πολυσακχαριτών, όπως η γλυκάνη, η χιτίνη και η γαλακτομαννάνη [115]. Οι γλυκάνες αποκαλύπτονται στο κυτταρικό τοίχωμα και αναγνωρίζονται από διάφορους υποδοχείς, όπως η δεκτίνη-1 και και στην συνέχεια, ενεργοποιούν την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή [124]. Επίσης, έχει αποδειχτεί ότι οι γλυκάνες απελευθερώνονται επίσης από το κυτταρικό τοίχωμα στο αίμα των ασθενών με μυκητικές λοιμώξεις και αυτό μπορεί να αποτελεί ένδειξη ότι αυτοί οι πολυσακχαρίτες τροποποιούν και ενεργοποιούν την ανοσολογική απάντηση [124]. Η βιοσύνθεση και η ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος είναι μια δυναμική διαδικασία, που ρυθμίζεται από πολλούς παράγοντες και ανταποκρίνεται σε στρεσογόνες καταστάσεις. Η καταλυτική υπομονάδα Fks1 της συνθετάσης της γλυκάνης μετακινείται στην επιφάνεια του κυττάρου σε περιπτώσεις ανακατασκευής του κυτταρικού τοιχώματος [125].

Καθώς οι εχινοκανδίνες έχουν ως στόχο την συνθετάση της γλυκάνης, που είναι υπεύθυνη για την παραγωγή της β-1,3-D-γλυκάνης, συνεπάγεται ότι τα κύτταρα, που εκτίθενται στα φάρμακα αυτά, θα προάγουν τους κυτταρικούς μηχανισμούς για την σύνθεση και την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος. Η αντοχή θα μπορούσε να προκύψει από γενετικές αλλαγές σε αυτά τα μονοπάτια [112]. Οι εχινοκανδίνες δημιουργούν τεράστιο στρες στο κύτταρο, αναστέλλοντας

την συνθετάση της γλυκάνης, με αποτέλεσμα την ελάττωση της γλυκάνης [126]. Η οδός της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) απαιτείται για την ανοχή της κασποφουγκίνης και η έκφραση των γονιδίων της εξαρτάται από τον παράγοντα Rlm1. Η καταστροφή του κυττάρου από την κασποφουγκίνη επάγει τους παράγοντες Wsc1 και Slt2, που με την σειρά τους προάγουν την προστατευτική απάντηση, ενεργοποιώντας την *de novo* σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος [126]. Υπάρχει ένα ολόκληρο δίκτυο του συμπλέγματος, το οποίο έχει την δυνατότητα να συντονίζει την απάντηση του κυττάρου στο στρες του κυτταρικού τοιχώματος που προκαλείται από την δράση των εχινοκανδινών και φαίνεται στην εικόνα 6. Δυστυχώς, η φύση των μηχανισμών της αναστολής της συνθετάσης της γλυκάνης απο τις εχινοκανδίνες δεν είναι καλά κατανοητή, όπως και η βιοχημεία του συμπλέγματος του ενζύμου [112].



Εικόνα 6: Δίκτυο μονοπατιών βιοσύνθεσης και ακεραιότητας του κυτταρικού τοιχώματος

Αναδιαμόρφωση του κυτταρικού τοιχώματος και η επίπτωση της θεραπείας με εχινοκανδίνες στην ανοσολογική απάντηση

Οι λοιμώξεις από *Candida* συχνά σχετίζονται με υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνητότητας σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Οι μηχανισμοί της φυσικής ανοσίας αναγνωρίζουν τους μύκητες μέσω κάποιων ειδικών μορίων στην επιφάνειά τους, όπως η β-γλυκάνη και η γαλακτομαννάνη, που αντιπροσωπεύουν πάνω από 90% του κυτταρικού τοιχώματος των ειδών *Candida* [127]. Η Τ-κυτταρική και η φαγοκυτταρική ανοσία αποτελούν τις πρωταρχικές προστατευτικές ανοσολογικές απαντήσεις έναντι στις μυκητικές λοιμώξεις. Οι αντιμυκητικοί παράγοντες, όπως η κασποφουγκίνη, εισβάλλουν στον μύκητα και οδηγούν σε ποικίλες ενδοκυτταρικές δραστηριότητες [127,128].

Η εσωτερική στιβάδα της β-γλυκάνης είναι ένα ουσιαστικό συστατικό που στοχοποιείται από μυκητοκτόνα αντισώματα, ανοσολογικούς υποδοχείς και τις εχινοκανδίνες [127,129]. Έχει αποδειχτεί ότι τα αντισώματα κατά της β-γλυκάνης μπορούν άμεσα να σκοτώσουν τους μύκητες και να συμβάλλουν στην κάθαρση της μυκητικής λοίμωξης [127,129]. Ο υποδοχέας της β-γλυκάνης, Δεκτίνη-1, που αποτελεί μία λεκτίνη τύπου C, η οποία εκφράζεται στα μονοκύτταρα/ μακροφάγα, ουδετερόφιλα και δενδριτικά κύτταρα, μπορεί να αναγνωρίσει την β-γλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα και να ενεργοποιήσει την προφλεγμονώδη απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος, υπερεκκρίνοντας κυτταροκίνες και TNF-α από τα μακροφάγα [127,129,130]. Ωστόσο, η εσωτερική στιβάδα της β-γλυκάνης καλύπτεται από την γαλακτομαννάνη, και επομένως, είναι σημαντική η

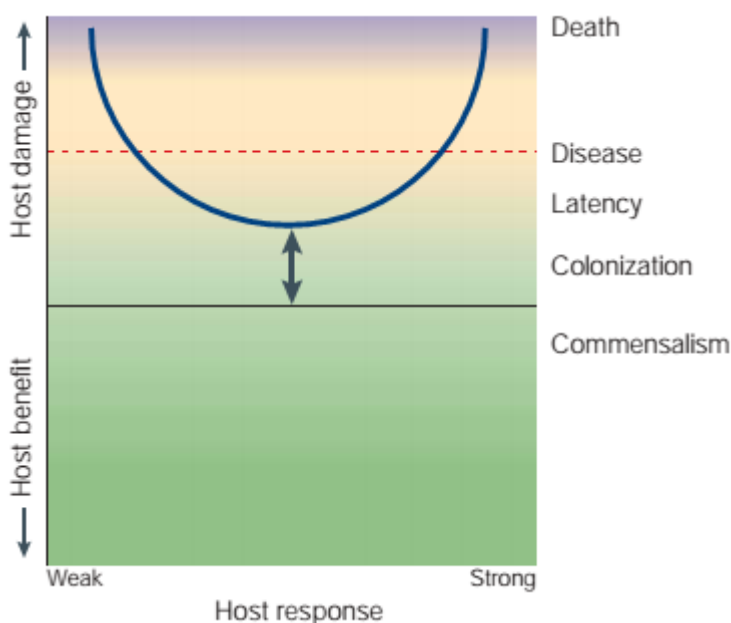
έκθεση της β-γλυκάνης στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος, ώστε να στοχοποιηθεί και να αρχίσει η ανοσολογική απάντηση του ξενιστή [127].

Η κασποφουγκίνη αποκαλύπτει την β-γλυκάνη σε συγκεντρώσεις μικρότερες από την MIC του φαρμάκου και μεταβάλλει την ποσότητα της β-γλυκάνης και την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος, συμβάλλοντας στην κάθαρση του μύκητα κατά την διάρκεια θεραπείας μιας λοίμωξης και αυτό επιτυγχάνεται με την προαγωγή της προφλεγμονώδους απάντησης στον μύκητα από τον ξενιστή [127,129]. Έτσι, η κασποφουγκίνη μπορεί να καταπολεμήσει τον μύκητα με διπλό τρόπο, σκοτώνοντάς τον σε υψηλές συγκεντρώσεις με άμεση κυτταροτοξικότητα μέσω της φαγοκυττάρωσης και των μεταβολών στην έκκριση των κυτταροκινών από τα ανοσοκύτταρα και αποκαλύπτοντας την β-γλυκάνη σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου, ενεργοποιώντας και τροποποιώντας την ανοσολογική απάντηση [127,129]. Τέλος, έχει αποδειχτεί ότι οι κυτταροκίνες, TNFα και IL-6, που εκκρίνονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού είναι προστατευτικοί παράγοντες στο μοντέλο διάχυτης καντιντίασης, προτείνοντας ότι η αποκάλυψη της β-γλυκάνης θα μπορούσε να προκαλέσει προφλεγμονώδη απάντηση και εξασθενημένη επιθετικότητα του μύκητα στην συστηματική νόσο [127,131].

Αλληλεπιδράσεις ξενιστή-παθογόνου και ανοσολογική ανοχή

Γενικά, οι αλληλεπιδράσεις ξενιστή-παθογόνου είναι ένα περίπλοκο και δυναμικό φαινόμενο και εξαρτάται από πολλαπλούς παράγοντες που καθορίζουν το αποτέλεσμα της λοίμωξης. Το αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης μπορεί να

είναι είτε ωφέλιμη, είτε καταστροφική για το παθογόνο, για τον ξενιστή ή και για τους δύο [132]. Για την κατανόηση της παθογένειας ενός μικροοργανισμού προτάθηκε το πλαίσιο καταστροφής-απάντησης (“damage-response framework”) του ξενιστή στην είσοδο του παθογόνου, το οποίο φαίνεται σχηματικά στην εικόνα 7. Η μικροβιακή παθογένεια είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ ξενιστή και μικροοργανισμού, και δεν οφείλεται ούτε στον μικροοργανισμό, ούτε στον ξενιστή μόνο. Η παθολογική έκβαση της αλληλεπίδρασης ξενιστή-μικροοργανισμού προσδιορίζεται από το ποσό της βλάβης στον ξενιστή και η ζημιά στον ξενιστή μπορεί να προκύπτει από μικροβιακούς παράγοντες και/ή την απόκριση του ξενιστή [132].



Εικόνα 7: Η βασική παραβολή του πλαισίου καταστροφής-απάντησης (“damage-response framework”) του ξενιστή στην είσοδο του παθογόνου.

Και ο ξενιστής και το παθογόνο μπορούν να μειώσουν το fitness cost μέσω των μηχανισμών αντοχής που μειώνουν την άμεση καταστροφή των ιστών από τα παθογόνα. Έτσι, η ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη προστατευτικών μηχανισμών που δεν καταλήγουν σε θάνατο του παθογόνου, αλλά αντίθετα, έχουν ως αποτέλεσμα την ανοχή του παθογόνου στην ανοσία [133].

Έτσι, σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, η ανοσολογική διέγερση του ξενιστή έχει ως αποτέλεσμα την προστασία του από τις ευκαιριακές λοιμώξεις των παθογόνων που προκαλούν βλάβη στον ξενιστή. Αντίθετα, σε ανοσοεπαρκείς ασθενείς, η υπερβολικά ισχυρή απάντηση του ανοσολογικού συστήματος του ξενιστή στην είσοδο του παθογόνου, μπορεί να προκαλέσει βλάβη στον ίδιο τον ξενιστή και τελικά, να υπάρχει όφελος από την ανοσολογική ανοχή (tolerance) του ξενιστή [132]. Επιπρόσθετα, αν και απαιτείται κάποιος βαθμός φλεγμονής για την προστασία, η συνεχής φλεγμονή επιδεινώνει τη νόσο και εμποδίζει την εκρίζωση του παθογόνου, αποδεικνύοντας μία διπλή φύση της φλεγμονώδους διαδικασίας κατά του μύκητα [134,135].

Μηχανισμοί αντοχής της *Candida* στις εχινοκανδίνες

Σε αντίθεση με τις αζόλες, δεν υπάρχει ο μηχανισμός της αντλίας εξόδου του φαρμάκου από το κύτταρο στις εχινοκανδίνες [112]. Το Fks1, η κύρια υπομονάδα της συνθετάσης της γλυκάνης, είναι ο πιθανός στόχος των εχινοκανδινών. Η αλλαγή σε αυτόν τον στόχο είναι η αιτία για μειωμένη ευαισθησία σε αυτά τα αντιμυκητικά. Κλινικά στελέχη της *C. albicans*, τα οποία εμφανίζουν υψηλές τιμές MIC, βρέθηκε ότι περιέχουν μεταλλάξεις στο Fks1 [136]. Δύο περιοχές-αλληλουχίες αμινοξέων

έχουν αναγνωρισθεί στο γονιδίωμα του Fks1, το «hot-spot 1 (HS1)» και το «hot-spot 2 (HS2)», τα οποία ευθύνονται για την μειωμένη ευαισθησία στην κασποφουγκίνη και τις υψηλές τιμές MIC σε αυτή [137].

Τα στελέχη *C. albicans* που παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία στην κασποφουγκίνη, παρουσιάζουν ταυτόχρονα και διασταυρούμενη αντοχή στην μिकाφουγκίνη και την ανιντουλαφουγκίνη, αποδεικνύοντας ότι ο μηχανισμός γενετικών αλλαγών στο Fks1 αφορά όλες τις εχινοκανδίνες γενικά [112,129]. Ωστόσο, οι τιμές MIC είναι μεγαλύτερες για την μिकाφουγκίνη και την κασποφουγκίνη σε ένα Wild type στέλεχος με πλήρη ευαισθησία. Επομένως, οι τιμές MIC για την κασποφουγκίνη είναι 4->16μg/ml, για την μिकाφουγκίνη είναι 1-16μg/ml, ενώ η ανιντουλαφουγκίνη διατηρεί τις χαμηλές τιμές MIC στα 0.5-2μg/ml [112]. Τα στελέχη που είναι ανθεκτικά στις εχινοκανδίνες, είναι ευαίσθητα στις αζόλες και τα πολυένια, αποδεικνύοντας ότι αυτός ο μηχανισμός είναι ειδικός μόνο για τις εχινοκανδίνες [112].

Οι μεταλλάξεις στο Fks1 hot spot εμποδίζουν την αναστολή της συνθετάσης της γλυκάνης, με αποτέλεσμα να απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση φαρμάκου για να επιτευχθεί η δράση του πάνω στην αναστολή του ενζύμου και να μειωθεί το μυκητικό φορτίο στους ιστούς [112,129,137]. Ο μηχανισμός αντοχής της μετάλλαξης του Fks1 επεκτείνεται και σε άλλα non-*albicans* είδη, όπως τα κλινικά στελέχη των *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* και *C. dubliniensis* [112], όπου οι μεταλλάξεις στο hot spot ελαττώνουν την ευαισθησία της συνθετάσης της γλυκάνης στις εχινοκανδίνες, παρόμοια με τα κλινικά στελέχη της *C. albicans* (Εικόνα 8). Μερικά είδη *Candida*, όπως η *C. parapsilosis* και η *C. guilliermondii*, παρουσιάζουν υψηλές τιμές MIC στις εχινοκανδίνες (MIC 0.5-8μg/ml),

τα οποία όμως αντιμετωπίζονται επιτυχώς κλινικά με τις εχινοκανδίνες στις καθορισμένες δόσεις [112,117]. Ο μηχανισμός της μειωμένης ευαισθησίας φαίνεται να οφείλεται στους πολυμορφισμούς των αμινοξέων στις περιοχές HS1 και HS2 του Fks1. Ιδιαίτερα στην *C. parapsilosis*, οφείλεται στην αντικατάσταση της αλανίνης από προλίνη, στην περιοχή HS1 του Fks1 (Εικόνα 8).

Εικόνα 8: Οι μεταλλάξεις στα Hot Spot 1 και 2 της υπομονάδας Fks1 στα διάφορα είδη *Candida*, και οι διάφοροι φαινότυποι που προκαλούν οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις. Κόκκινο χρώμα: ανθεκτικά στελέχη με MIC στην κασποφουγκίνη >2μg/ml, Κίτρινο χρώμα: στελέχη με μειωμένη αντοχή και με MIC στην κασποφουγκίνη 1-2μg/ml, Πράσινο χρώμα: στελέχη ευαίσθητα στην κασποφουγκίνη.

Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός αντοχής των *Candida spp.* στις εχινοκανδίνες μπορεί να προκύψει από τις γενετικές αλλαγές στα μονοπάτια που ρυθμίζουν την σύνθεση και την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα [112,129]. Οι εχινοκανδίνες δημιουργούν τεράστιο στρες στο κύτταρο, αναστέλλοντας την συνθετάση της γλυκάνης, με αποτέλεσμα την ελάττωση της γλυκάνης [126]. Η οδός της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) απαιτείται για την ανοχή στην κασποφουγκίνη και η έκφραση των γονιδίων της εξαρτάται από τον μεταγραφικό παράγοντα Rlm1. Η

καταστροφή του κυττάρου από την κασποφουγκίνη επάγει τους παράγοντες Wsc1 και Sit2, και την φωσφορορυλίωση της πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK), που με την σειρά τους προάγουν την προστατευτική απάντηση, ενεργοποιώντας την *de novo* σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, παράγοντας άλλους πολυσακχαρίτες, όπως είναι η χιτίνη [126,129]. Οπότε, η δημιουργία μεταλλάξεων στα γονίδια που ρυθμίζουν την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα και η υπερέκφρασή τους, είναι πιθανόν να έχουν ως αποτέλεσμα την αντοχή των μυκήτων στις εχινοκανδίνες [129].

Επίσης, όπως έχει ήδη αναφερθεί, το κυτταρικό τοίχωμα του μύκητα είναι μία δυναμική δομή και η αναστολή της σύνθεσης ενός συστατικού του κυτταρικού τοιχώματος θα οδηγήσει σε αύξηση σύνθεσης ενός άλλου συστατικού [129]. Επομένως, η αναστολή της σύνθεσης της β-1,3-D-γλυκάνης από την δράση των εχινοκανδινών καταλήγει σε αντισταθμιστική αύξηση της παραγωγής της χιτίνης και αυτό έχει παρατηρηθεί στην *C. albicans* και σε άλλα είδη *Candida*. Η ενεργοποίηση της παραγωγής της χιτίνης πραγματοποιείται μέσω του μονοπατιού της πρωτεϊνικής κινάσης και αυτή η αύξηση της χιτίνης μπορεί να είναι υπεύθυνη για την μείωση της ευαισθησίας στις εχινοκανδίνες και να αποτελεί έναν πιθανό μηχανισμό αντοχής στις εχινοκανδίνες [129, 138-139].

Παράδοξο φαινόμενο: Θεωρείται αντοχή στον αντιμυκητικό παράγοντα?

Το παράδοξο φαινόμενο ορίζεται ως η ανάπτυξη μικροοργανισμών που είναι ευαίσθητοι στις εχινοκανδίνες σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις του φαρμάκου, πολύ μεγαλύτερες από το MIC στο συγκεκριμένο φάρμακο. Πρώτα περιγράφηκε το 2004, όπου παρατηρήθηκε μία ανάπτυξη των στελεχών της *C. albicans* σε πολύ υψηλές

συγκεντρώσεις κασποφουγκίνης. Αυτά τα στελέχη είχαν μία φυσιολογική ευαισθησία με τυπικές χαμηλές τιμές MIC, αλλά παράδοξα εμφάνιζαν breakthrough ανάπτυξη σε υψηλά επίπεδα του φαρμάκου (>16μg/ml) [140]. Η παράδοξη ανάπτυξη δεν σχετίζεται με μεταλλάξεις στο Fks1 ή σε τροποποίηση της ευαισθησίας του συμπλέγματος της συνθετάσης της γλυκάνης στις εχινοκανδίνες [141]. Μία βιοχημική ανάλυση του κυτταρικού τοιχώματος ενός στελέχους *C. albicans*, στο οποίο παρατηρήθηκε παράδοξη ανάπτυξη, απέδειξε μία τεράστια αύξηση 898% στην ποσότητα της χιτίνης, εις βάρος των β-1,3 γλυκάνης και β-1,6 γλυκάνης, όπου παρατηρήθηκε μείωση μετά την δράση της κασποφουγκίνης [142]. Η *in vivo* σημασία του παράδοξου φαινομένου παραμένει άγνωστη, αφού τα επίπεδα φαρμάκου που απαιτούνται είναι υπερβολικά υψηλότερα από τις συνηθισμένες δόσεις των φαρμάκων που χορηγούνται, ωστόσο είναι σημαντικό να τονιστεί η ανάγκη για την ανακάλυψη άλλων μηχανισμών αντοχής, όπως είναι η ενεργοποίηση της σύνθεσης της χιτίνης [112].

Κριτήρια για κλινική αντοχή στις εχινοκανδίνες

Η αυξημένη τιμή MIC από μόνη της δεν αποτελεί επαρκές κριτήριο για να καθοριστεί η αντοχή. Επιπλέον, ένας συνδυασμός των 1) αυξημένης τιμής MIC στις εχινοκανδίνες, 2) χαρακτηριστικών μεταλλάξεων στην υπομονάδα Fks1 της συνθετάσης της γλυκάνης και 3) χαρακτηριστικής αύξησης της συγκέντρωσης του φαρμάκου για να ανασταλεί η δράση της συνθετάσης της γλυκάνης, αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη της αντοχής. Υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί αντοχής, που μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση των τιμών MIC, αλλά μόνο ο μηχανισμός των μεταλλάξεων στο Fks1 σχετίζεται με την κλινική αντοχή [112].

Σκοπός της μελέτης

Η *Candida parapsilosis* αποτελεί ένα από τα πιο κοινά αίτια διηθητικής καντιντίασης [13,65]. Κατά την διάρκεια των τελευταίων 20 χρόνων, η επίπτωση της μόμωσης από *C. parapsilosis* έχει αυξηθεί [65,143], ιδιαίτερα σε μονάδες νεογνών και σε μονάδες εντατικής θεραπείας [58,70,144-146]. Γενικά, η νοσηρότητα και η θνητότητα της διηθητικής καντιντίασης από *C. parapsilosis* είναι μειωμένη, σε σχέση με αυτή που προκαλείται από *C. albicans*, λόγω της χαμηλής λοιμογόνου δύναμης της *C. parapsilosis* [11,147].

Οι εχινοκανδίνες (κασποφουγκίνη, μикаφουγκίνη και ανιντουλαφουγκίνη) δρουν αναστέλλοντας την σύνθεση της β-γλυκάνης, ενός πολυσακχαρίτη που βρίσκεται στο κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων, έχουν ευρέως φάσματος μυκητοκτόνο δράση και αποτελούν θεραπεία εκλογής για την διηθητική καντιντίαση [26,148]. Ωστόσο, οι εχινοκανδίνες παρουσιάζουν μειωμένη *in vitro* δραστηριότητα κατά της *Candida parapsilosis* που προκαλεί breakthrough λοιμώξεις σε ασθενείς υπό θεραπεία με τα φάρμακα αυτά [26,65,149-151], ενώ, πρόσφατα, έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις κλινικής αποτυχίας, οφειλόμενες σε ανθεκτικά στην κασποφουγκίνη στελέχη [152,153]. Ιδιαίτερα, έχει αναφερθεί κλινική αποτυχία που οφείλεται σε στελέχη που είναι ανθεκτικά στην κασποφουγκίνη σε ασθενείς που λαμβάνουν κασποφουγκίνη για παρατεταμένο διάστημα (>15 ημέρες) [101,108]. Επίσης, μία αύξηση στην επίπτωση των λοιμώξεων από *C. parapsilosis*, που οφείλεται μερικώς στην αυξημένη χρήση της κασποφουγκίνης, έχει παρατηρηθεί σε αρκετά αντικαρκινικά κέντρα και ΜΕΘ [101,108,154]. Η πρόσφατη αλλαγή στην επιδημιολογία των καντιντιάσεων προβληματίζει σχετικά με την εμπειρική θεραπεία της διηθητικής καντιντίασης.

Ο βαθμός διασταυρούμενης αντοχής της *Candida parapsilosis* στις εχινοκανδίνες *in vivo* δεν είναι ακόμα γνωστός και καλά κατανοητός, ενώ η απώλεια «fitness» που σχετίζεται με την αντοχή στην κασποφουγκίνη δεν έχει συστηματικά μελετηθεί για την *C. parapsilosis*. Επιπλέον, οι εχινοκανδίνες έχουν σημαντικές ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες, μέσω της «αποκάλυψης» της β-γλυκάνης, του κύριου ανοσοδιεγερτικού μορίου του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα. Παρά την επισήμανση του ανοσοτροποποιητικού μηχανισμού των εχινοκανδινών, μεγάλο τμήμα της κλινικής δράσης τους κατά της *C. parapsilosis* παραμένει άγνωστο, καθώς συγκριτικές *in vivo* μελέτες είναι λίγες.

Η ανιντουλαφουγκίνη διατηρεί την *in vitro* δράση της κατά των περισσότερων στελεχών *C. parapsilosis* που είναι ανθεκτικά *in vitro* σε κασποφουγκίνη και μикаφουγκίνη [122,154,155]. Ως εκ τούτου, είναι εύλογο να υποθέσουμε ότι οι *in vitro* διαφορές στην δράση τους συμβαδίζουν με σημαντικές ποσοτικές ή/και ποιοτικές *in vivo* αλλαγές στην ανοσολογική απάντηση του ξενιστή και στην συνέχεια, σε σημαντικές διαφορές στην *in vivo* αντιμυκητική τους αποτελεσματικότητα και στην έκβαση της λοίμωξης.

Ο σκοπός της μελέτης είναι να καθιερωθεί ένα πειραματικό μοντέλο διάχυτης καντιντίασης σε ανοσοεπαρκή ποντίκια, που μιμείται ανάλογες συνθήκες στον άνθρωπο, και να συγκριθεί η *in vivo* αποτελεσματικότητα της ανιντουλαφουγκίνης και της κασποφουγκίνης κατά διαφορετικών στελεχών *C. parapsilosis* που είναι ευαίσθητα *in vitro* στην ανιντουλαφουγκίνη, ενώ παρουσιάζουν διαφορετικού βαθμού αντοχή *in vitro* στην κασποφουγκίνη.

Απώτερος στόχος της μελέτης είναι να δοθούν σημαντικές πληροφορίες για την καλύτερη διαχείριση των λοιμώξεων από *C. parapsilosis* που παρατηρούνται με

αυξανόμενη συχνότητα σε ανοσοκατεσταλμένους, σε ασθενείς που νοσηλεύονται στην ΜΕΘ και στα νεογνά.

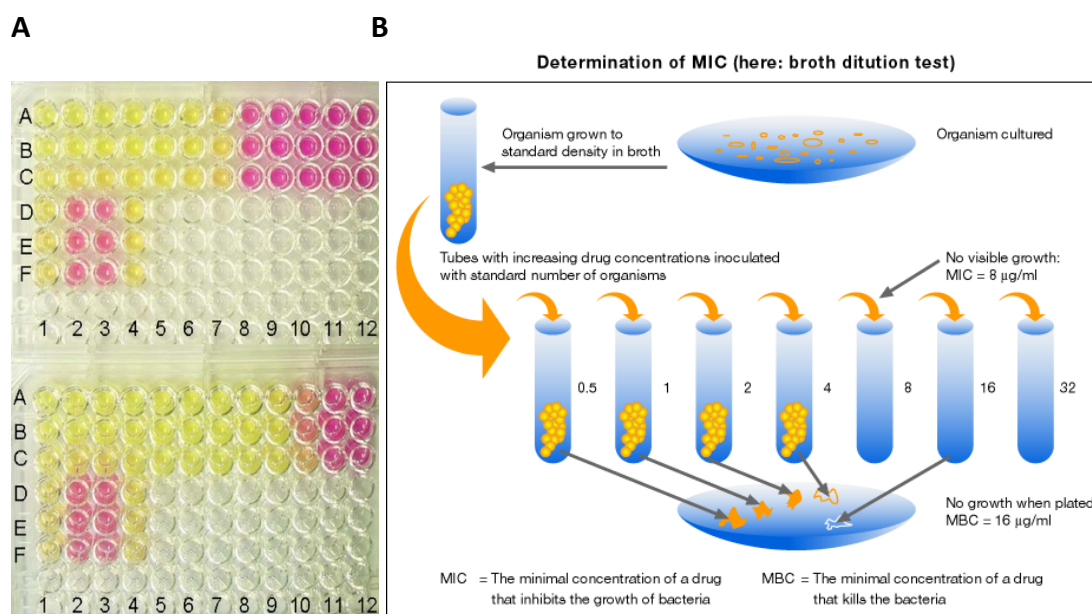
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Δοκιμασία Ευαισθησίας

Η δοκιμασία της ευαισθησίας των στελεχών *C. parapsilosis* στα αντιμυκητικά φάρμακα πραγματοποιήθηκε δύο φορές με την σταθμισμένη μέθοδο «broth microdilution» σύμφωνα με τις οδηγίες του Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M27-A3) για μύκητες [156]. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν ειδικά πιάτα με RPMI, που αποτελεί μέσο ανάπτυξης για τους μύκητες, όπως φαίνεται στην εικόνα 9 [156,157]. Στην συνέχεια, έγιναν διαδοχικές αραιώσεις της συγκέντρωσης της κάθε εχινοκανδίνης (0,03 µg/ml - 16 µg/ml), οι οποίες

ενοφθαλμίστηκαν στα ειδικά πιάτα μαζί με $5 \times 10^3 - 10^4$ βλαστοσπόρια της *C. parapsilosis*. Στην συνέχεια, τα ειδικά πιάτα επώασθησαν στους 37°C για 24 και 48 ώρες και καθορίστηκαν οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MICs, σε mg/L) όλων των στελεχών, οι οποίες προσδιορίστηκαν μακροσκοπικά. Η MIC ορίζεται ως μία μείωση στην ανάπτυξη των μυκήτων, της τάξεως > 50% σε σχέση με το control, όπου υπάρχει μύκητας με θρεπτικό υλικό, χωρίς αντιμυκητικά φάρμακα. Τα αποτελέσματα των MIC των τριών στελεχών *C. parapsilosis* έναντι στις εχινοκανδίνες φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 4).



Εικόνα 9: Ειδικό πιάτο με μέσο ανάπτυξης RPMI για τον καθορισμό ευαισθησίας στα αντιμυκητικά φάρμακα με την μέθοδο «broth microdilution» (Εικόνα 9Α), και μέθοδος καθορισμού του MIC (Εικόνα 9Β).

Στελέχη *Candida parapsilosis*

Δύο καλά χαρακτηρισμένα, γενοτυπικά ταυτόσημα, κλινικά στελέχη *Candida parapsilosis* (στελέχη 35176 και 35177) που απομονώθηκαν από ασθενή με ενδοκαρδίτιδα προσθετικής βαλβίδας υπό θεραπεία με κασποφουγκίνη (το πρώτο στέλεχος ήταν ανθεκτικό στην κασποφουγκίνη και απομονώθηκε μετά την θεραπεία της ενδοκαρδίτιδας με κασποφουγκίνη, ενώ το δεύτερο στέλεχος ήταν ευαίσθητο στην κασποφουγκίνη και απομονώθηκε πριν την έναρξη της θεραπείας με κασποφουγκίνη) και καλλιεργήθηκαν στο Infectious Diseases Laboratory του Wayne State University στο Detroit, Michigan, USA [101] και ένα κλινικό στέλεχος

(20447.040) που απομονώθηκε από το αίμα ασθενή στο St. Lukes Episcopal Hospital στο Houston, Texas, USA, χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Και τα τρία παραπάνω στελέχη ήταν ευαίσθητα στην αντιντουλαφουγκίνη (MIC 1-2 mg/L). Τα δύο στελέχη παρουσίαζαν μειωμένη ευαισθησία στην κασποφουγκίνη (MIC >16 mg/L, CAS-R; MIC 4 mg/L, CAS-I) και το τρίτο στέλεχος ήταν ευαίσθητο στην κασποφουγκίνη (MIC 2 mg/L, CAS-S) (Πίνακας 5). Τα στελέχη αποθηκεύτηκαν στους -80°C και σε 10% γλυκερόλη.

Στελέχη <i>C. parapsilosis</i>	Αντιμυκητικά	MIC (mg/L)	Φαινότυπος	Πηγή απομόνωσης
35176	CAS	>16	R	Ενδοκαρδίτιδα προσθετικής βαλβίδας
	ANF	2	S	
35177	CAS	2	S	Ενδοκαρδίτιδα προσθετικής βαλβίδας
	ANF	1	S	
20447.040	CAS	4	I	Αίμα
	ANF	1	S	

Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά και ευαισθησίες των στελεχών *C. parapsilosis* στις εχινοκανδίνες. CAS: Κασποφουγκίνη, ANF: Ανιττουλαφουγκίνη, S: Ευαίσθητο, R: Ανθεκτικό, I: Ενδιάμεσης ευαισθησίας.

Πριν από κάθε πείραμα, τα στελέχη μεταφέρονταν σε Sabouraud dextrose agar (SDA) και επωάζονταν στους 37°C για 48 ώρες. Στην συνέχεια, μία μορφολογικά αναγνωρίσιμη αποικία που πάρθηκε από το άγαρ, υποκαλλιεργούνταν δύο φορές σε διάλυμα Sabouraud dextrose και τοποθετούνταν σε rotating incubator στους 37°C για όλη την διάρκεια της νύχτας. Τα κύτταρα του μύκητα συλλέγονταν με φυγοκέντρηση, πλένονταν δύο φορές με phosphate-buffered saline (PBS) και τελικά υπολογίζονταν με την χρήση του hemocytometer Neubauer. Για την μέτρηση των μυκητικών κυττάρων, 10μl δείγματος αραιωμένου

με PBS εισάγονταν μέσω της ειδικής υποδοχής στην πλάκα Neubauer (αιματοκυτταρόμετρο) (Εικόνα 10). Στο οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση x40) προσδιοριζόταν ο αριθμός των κυττάρων στα τέσσερα τετράγωνα γύρω από τον κεντρικό σταυρό (τετράγωνα 1,2,3,4 στην εικόνα 8) και υπολογιζόταν ο μέσος όρος. Η συγκέντρωση των κυττάρων στο μετρούμενο δείγμα προσδιοριζόταν με τον τύπο:

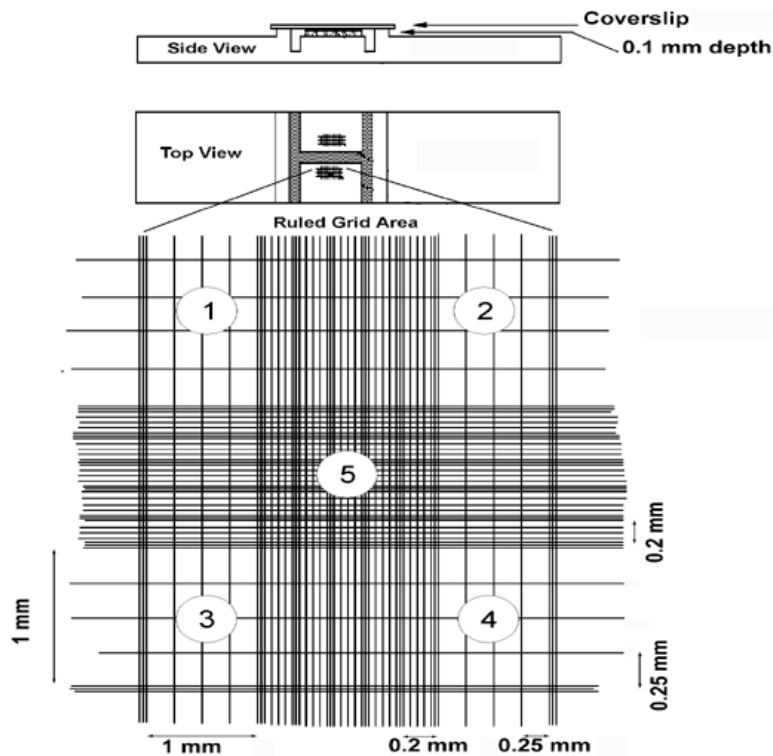
$$n \text{ κυττάρων στα τετράγωνα 1-4 (μέσος όρος)} \times \text{αραίωση με PBS} \times 10^4,$$

όπου η αραίωση συνήθως ήταν 1/100, δηλαδή $\times 100$.

Το inoculum προσδιορίστηκε σε $\times 10^x/\text{ml}$, χρησιμοποιώντας διαδοχικές αραιώσεις με PBS. Για την εξακρίβωση του inoculum της *Candida parapsilosis* που προκαλεί λοίμωξη, στρώθηκαν οι σωστές αραιωμένες συγκεντρώσεις μύκητα σε τρυβλία YAG και υπολογίστηκαν οι αποικίες μετά από επώαση για 24 ώρες.

Αντιμυκητικοί Παράγοντες

Οι κλινικές ουσίες της ανιντουλαφουγκίνης (Ecalta; Pfizer Pharmaceuticals, Athens, Greece) και της κασποφουγκίνης (Cancidas; MSD Pharmaceuticals, Athens, Greece) χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα πειράματα. Για τα *in vivo* πειράματα, τα αντιμυκητικά ανακατασκευάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ενώ για την δοκιμασία ευαισθησίας, τα αντιμυκητικά ανασυστάθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI M27-A3 [156]. Η ανιντουλαφουγκίνη διαλύθηκε σε dimethyl sulfoxide 1% (DMSO 1%, Sigma), ενώ η κασποφουγκίνη σε στείρο νερό. Τα διαλύματα του κάθε αντιμυκητικού παράγοντα που αποθηκεύτηκαν σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις (25 mg/mL για την ανιντουλαφουγκίνη, 5mg/mL για την κασποφουγκίνη) στους -70 °C.



Εικόνα 10: Πλάκα hemocytometer Neubauer

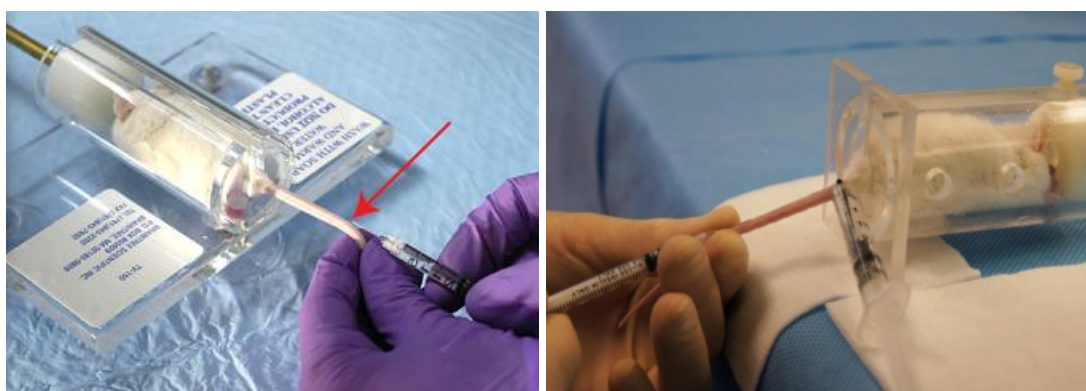
Ποντίκια

Θηλυκά BALB/c ποντίκια 6-8 εβδομάδων [The Foundation for Research and Technology - Hellas (FORTH)/IMBB, Heraklion, Crete, Greece], που ζύγιζαν 18-22 g το καθένα, χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα πειράματα. Τα ποντίκια βρίσκονταν σε αποστειρωμένα κλουβιά (5 σε κάθε κλουβί) με οροφή φέρουσα φίλτρο στις εγκαταστάσεις εκτροφής ζώων του Πανεπιστημίου Κρήτης και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε αποστειρωμένη τροφή και νερό. Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τα υψηλότερα πρότυπα φροντίδας και διαχείρισης ζώων και εγκρίθηκαν από την Επιτροπή της χρήσης και διαχείρισης ζώων του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Δημιουργία μοντέλου ποντικών με διάχυτη καντιντίαση

Τα αρχικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν για να καθοριστεί η ιδανική ποσότητα ενέσιμων βλαστοσπορίων *C. parapsilosis* για την μελέτη της αντιμυκητικής δράσης των εχινοκανδινών (εύρος της ποσότητας: 5×10^7 - 2×10^8 ολικά βλαστοσπόρια ανά ποντίκι).

Τα ποντίκια BALB/c χωρίστηκαν σε ομάδες (n=10 ανά ομάδα, διαφορετικά αναφέρεται παρακάτω) και μολύνθηκαν ενδοφλεβίως, μέσω των τελικών φλεβών της ουράς (Εικόνα 11), με τρία διαφορετικά στελέχη *C. parapsilosis*, ευαίσθητα στην ανιντουλαφουγκίνη και με διαφορετικού βαθμού αντοχή στην κασποφουγκίνη. Η μόλυνση έγινε με διαφορετικές και διαδοχικές ποσότητες βλαστοσπορίων σε διάλυμα 100 μl φωσφορικού διαλύματος (PBS), προκειμένου να επιτευχθεί η κατάλληλη δόση για την δημιουργία του μοντέλου διάχυτης καντιντίασης.



Εικόνα 11: Τεχνική ενδοφλέβιας χορήγησης διαλύματος *C. parapsilosis* στις τελικές φλέβες της ουράς των ποντικών

Τα ποντίκια, στην συνέχεια, παρακολουθούνταν 3 φορές την ημέρα για 14 ημέρες μετά την μόλυνση, με σκοπό την εκτίμηση της συνολικής επιβίωσης. Το βάρος σώματος του κάθε ποντικού καταγραφόταν καθημερινά για 14 ημέρες μετά την λοίμωξη. Τα θνησιγενή ποντίκια θανατώνονταν και καταγράφονταν σαν να έχουν πεθάνει την επόμενη ημέρα.

Αφού βρέθηκε η ιδανική ποσότητα των ενέσιμων βλαστοσπορίων του μύκητα, το μοντέλο σταθμίστηκε με την εκτίμηση της επιβίωσης, την ανάλυση του μυκητικού φορτίου στα όργανα των ζώων (ήπαρ, νεφροί και σπλήνας), την παθολογοανατομική εξέταση και την καθημερινή μέτρηση της απώλειας βάρους για 14 ημέρες μετά την μόλυνση.

***In vivo* εκτίμηση της θεραπείας**

Η αποτελεσματικότητα των αντίστοιχων θεραπειών με εχινοκανδίνες αναλύθηκαν μέσω τριών διαφορετικών πειραμάτων, με το καθένα να πραγματοποιείται ανεξάρτητα. Αυτά είναι: (i) η μελέτη του μυκητικού φορτίου των οργάνων-στόχων (ήπαρ-σπλήνας-νεφροί), η οποία περιλαμβάνει και την ανάλυση του ποσοστού κάθαρσης της *C. parapsilosis* από τα όργανα-στόχους, (ii) η ανάλυση της απώλειας βάρους των ποντικών που έχουν μολυνθεί με *C. parapsilosis* και ακολουθούν συγκεκριμένες θεραπείες και (iii) η παθολογοανατομική εξέταση των νεφρών ποντικών που έχουν μολυνθεί με *C. parapsilosis*, με σκοπό την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την ανάλυση του μυκητικού φορτίου των οργάνων-στόχων.

Η κινητική του μυκητικού φορτίου των οργάνων-στόχων (ήπαρ-σπλήνας-νεφροί) ποντικών που μολύνθηκαν με τα τρία διαφορετικά στελέχη *C. parapsilosis*,

και πιο συγκεκριμένα, η μείωση του μυκητικού φορτίου, αναλύθηκε θανατώνοντας τα ποντίκια στις 12, 24, 48, 72 και 120 ώρες μετά την μόλυνση (n= 3 ποντίκια ανά χρονικό σημείο, άρα συνολικά 3x5=15 ποντίκια ανά πείραμα με κάθε στέλεχος *C. parapsilosis*) και υπολογίζοντας τον αριθμό των αποικιών/γραμμάριο ιστού οργάνου. Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 15 ποντίκια για κάθε πείραμα κινητικής του μυκητικού φορτίου.

Έξι ώρες μετά την μόλυνση των ποντικών με το καθένα στέλεχος *C. parapsilosis*, πραγματοποιήθηκε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση της κάθε εχινοκανδίνης (κασποφουγκίνη, ανιντουλαφουγκίνη) σε δύο δόσεις (1 mg/kg και 10 mg/kg) ή DMSO (control group) μία φορά ημερησίως για 7 ημέρες ή μέχρι τον θάνατο του ποντικού. Οι παραπάνω συγκεκριμένες δόσεις επιλέχθηκαν, επειδή χρησιμοποιήθηκαν σε προηγούμενες μελέτες είτε σε ουδετεροπενικά, είτε σε ανοσοεπαρκή μοντέλα ποντικών διάχυτης καντιντίασης και αντιστοιχούν στις δόσεις που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία διάχυτης καντιντίασης στους ανθρώπους [155-158].



Εικόνα 12: Τεχνική ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης εχινοκανδινών

Πιο συγκεκριμένα, σε επιλεγμένα ποντίκια, οι νεφροί, ο σπλήνας και το ήπαρ αφαιρέθηκαν με άσηπτη διαδικασία και ζυγίστηκαν (n=6), αφού θανατώθηκαν την

δεύτερη ημέρα μετά την μόλυνση. Τα όργανα-στόχοι ομογενοποιήθηκαν σε 1ml PBS με έναν ειδικό ομογενοποιητή ιστών (Polytron dispensing and mixing technology PT 1600 E; Kinematica, AG, Luzern, Switzerland) (Εικόνα 13A) και στην συνέχεια, καθορίστηκε το μυκητικό φορτίο, στρώνοντας στην επιφάνεια των τρυβλίων με Sabouraud dextrose agar και 5% (w/v) chloramphenicol, κάνοντας διαδοχικές αραιώσεις (Εικόνα 13B). Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για 48 ώρες. Μετρήθηκαν οι αποικίες και υπολογίστηκε ο αριθμός των CFU ανά γραμμάριο ιστού οργάνων για κάθε ποντίκι. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν ως ο μέσος όρος του μυκητικού φορτίου \pm τυπική απόκλιση (SD) που πραγματοποιήθηκαν σε δύο ανεξάρτητα πειράματα.

Η αποτελεσματικότητα των εχνοκανδινών εκτιμήθηκε επίσης, από την ανάλυση της απώλειας βάρους στα ποντίκια που μολύνθηκαν με *C. parapsilosis* και θεραπεύτηκαν με τους συγκεκριμένους αντιμυκητικούς παράγοντες. Σε διαφορετικά πειράματα, 6 ώρες μετά την μόλυνση με το καθένα στέλεχος *C. parapsilosis*, χορηγήθηκαν στα ποντίκια (n= 5 ανά ομάδα) αντιμυκητικά φάρμακα (κασποφουγκίνη και ανιντουλαφουγκίνη) σε δύο δόσεις (1mg/kg και 10mg/kg) ή DMSO (control group) ενδοπεριτοναϊκά, με την τεχνική που φαίνεται στην εικόνα 12. Η κάθε ομάδα θεραπείας περιείχε συνολικά πέντε ποντίκια.

A



B



Εικόνα 13: Α] Ομογενοποιητής ιστών (Polytron dispensing and mixing technology) και Β] Τρυβλίο με Sabouraud dextrose agar και 5% (w/v) chloramphenicol, όπου φαίνονται οι αποικίες της *C. parapsilosis*

Για να εκτιμηθούν περαιτέρω οι διαφορές στο μυκητικό φορτίο των οργάνων στα ποντίκια που μολύνθηκαν με τα τρία στελέχη *C. parapsilosis* (CAS-S, CAS-I και CAS-R), πραγματοποιήθηκε παθολογοανατομική εξέταση των νεφρών σε επιλεγμένα ποντίκια (n=3), που θανατώθηκαν την δεύτερη ημέρα μετά την μόλυνση και έλαβαν θεραπεία, ακριβώς όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Συνοπτικά, οι νεφροί των ποντικών αφαιρέθηκαν, αποθηκεύτηκαν σε 10% formaldehyde, και εμφυτεύτηκαν σε κερι παραφίνης για παθολογοανατομική εξέταση. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες τομές στους νεφρούς, στις

οποίες έγινε χρώση με αιματοξυλίνη και ηωσίνη, καθώς και με periodic acid-schiff (PAS), που αποτελεί μία πιο ειδική χρώση για την πιθανή ανεύρεση βλαστοσπορίων ή/και υφών. Τέλος, οι πλάκες με τις τομές των νεφρών και τις ειδικές χρώσεις εξετάστηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με την τυφλή μέθοδο, χωρίς δηλαδή, να είναι γνωστό εκ των προτέρων από ποιά ομάδα θεραπείας προέρχεται η τομή του νεφρού. Ο βαθμός των παθολογοανατομικών ευρημάτων καθορίστηκε από ένα σκορ που χρησιμοποιήσαμε, που κυμαίνεται από (-) έως (++). Για παράδειγμα, όταν το σκορ είναι (-), σημαίνει απουσία των βλαστοσπορίων ή κάποιου σχηματισμού υφής (ψευδοϋφές) σε τομές νεφρών. Όταν το σκορ είναι (+), σημαίνει αραιά, διάσπαρτα βλαστοσπόρια (≤ 3 βλαστοσπόρια) ή/και λίγες εστίες βλαστοσπορίων ή ψευδοϋφών (<2 εστίες) στις τομές νεφρών. Τέλος, όταν το σκορ είναι (++), σημαίνει άφθονες (≥ 2 εστίες) ή/και μεγάλες (≥ 3 βλαστοσπόρια) εστίες βλαστοσπορίων ή ψευδοϋφών στις τομές νεφρών.

Μέθοδος ELISA για προσδιορισμό IL-6 και TNF- α

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων των κυτταροκινών (IL-6 και TNF- α) που εκκρίνονται στο υπερκείμενο διάλυμα του νεφρού και του ήπατος των ποντικών που μολύνθηκαν με τα 3 διαφορετικά στελέχη *C. parapsilosis* και έλαβαν θεραπεία με κασποφουγκίνη και ανιντουλαφουγκίνη σε υψηλή και χαμηλή δόση (10mg/kg και 1mg/kg, αντίστοιχα) ή DMSO (controls), χρησιμοποιήθηκε η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA. Το τεστ διεξάγεται σε ένα ειδικό τρυβλίο μικροτιτλοδότησης (Corning Costar 9018 microtiter 96-wells plate) επικαλυμμένο με 100 μ L/well anti-mouse μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο σφραγίζεται και φυλάσσεται στους 4°C κατά την διάρκεια της νύχτας. Στην συνέχεια, το πιάτο πλένεται καλά 5 φορές με

>250 $\mu\text{L}/\text{well}$ ειδικού διαλύματος και τινάσσεται, ώστε το πλύσιμο να είναι πιο αποτελεσματικό και τοποθετείται 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ ενός αραιωτικού διαλύτη ανίχνευσης, το οποίο παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα. Μετά από 5 πλυσίματα, καθορίζεται η καμπύλη αναφοράς και πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις του υπερκείμενου, οι οποίες μεταφέρονται 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ του κάθε δείγματος στις κοιλότητες (wells). Το πιάτο καλύπτεται και παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Μετά από 5 πλυσίματα, προστίθεται 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ από το αντίσωμα ανίχνευσης, παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και ξαναπλένεται 5 φορές. Στην συνέχεια, τοποθετείται 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ από το ένζυμο-στρεπταβιδίνη σημασμένο πολυμερές, το πιάτο επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, πλένεται 7 φορές και ακολούθως, ένα χρωμογόνο υπόστρωμα εισάγεται στο τρυβλίο μικροτιτλοδότησης, το οποίο επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και η διαδικασία σταματά με 50 μL ειδικού διαλύματος σε κάθε διάλυμα. Έτσι, η δεσμευμένη κυτταροκίνη συνδέεται με το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα ανίχνευσης και το ένζυμο-στρεπταβιδίνη σημασμένο πολυμερές και με την βοήθεια του χρωμογόνου υποστρώματος, παράγεται ένα έγχρωμο προϊόν το οποίο προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος 450nm και τέλος, αναλύονται τα δεδομένα.

Στατιστική ανάλυση

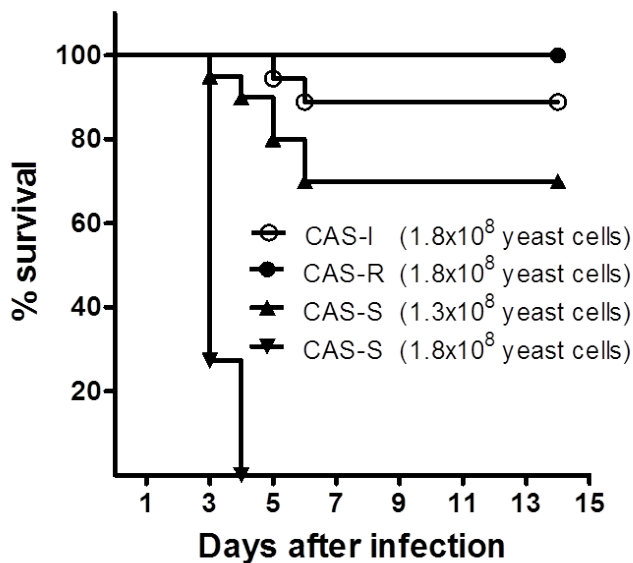
Όλα τα δεδομένα των γραφικών εκφράζονται ως $\text{means} \pm \text{SD}$ και αναλύθηκαν στατιστικά μέσω ANOVA με Dunnett's post test για πολλαπλές συγκρίσεις, χρησιμοποιώντας το Prism software (Prism 5; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Οι καμπύλες επιβίωσης υπολογίστηκαν με την μέθοδο Kaplan-

Meier και συγκρίθηκαν με το Mantel-Cox (log rank) test. P value < 0.05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

B. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

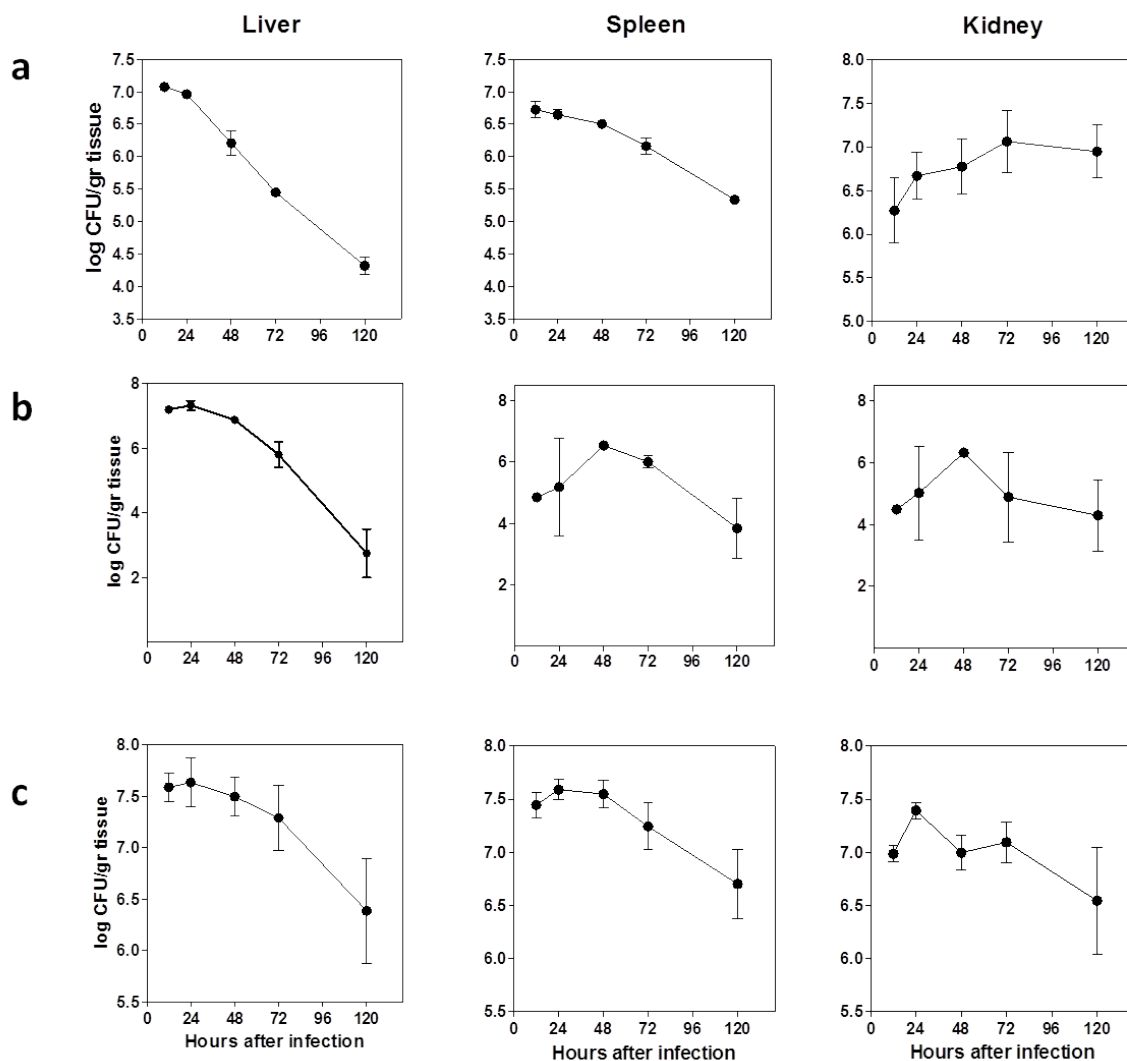
Καθιέρωση ενός μοντέλου ποντικών διάχυτης καντιντίασης από *C. parapsilosis*

Η *C. parapsilosis* συνήθως επηρεάζει ανοσοεπαρκείς ασθενείς και χαρακτηρίζεται από μειωμένη θνητότητα σε σχέση με άλλα είδη *Candida*. Έτσι, επιχειρήσαμε να καθιερώσουμε ένα φυσιολογικά συγγενές μοντέλο με χαμηλά ποσοστά θνητότητας σε μη ουδετεροπενικά ποντίκια. Τα αρχικά πειράματα, χρησιμοποιώντας ένα εύρος συγκεντρώσεων *C. parapsilosis* (10^6 - 2×10^8 βλαστοσπόρια ανά ποντίκι), έδειξαν ότι η ιδανική ποσότητα ενέσιμων βλαστοσπορίων *C. parapsilosis* είναι 1.8×10^8 βλαστοσπόρια/ποντίκι για τα στελέχη που παρουσιάζουν χαμηλού ή υψηλού βαθμού αντοχή στην κασποφουγκίνη (στελέχη CAS-I και CAS-R), ενώ για το ευαίσθητο στέλεχος στην κασποφουγκίνη (CAS-S στέλεχος), η ιδανική ποσότητα είναι 1.3×10^8 βλαστοσπόρια/ποντίκι. Οι συγκεκριμένες ποσότητες έδωσαν σταθερά, επαναλαμβανόμενα αποτελέσματα και προκαλώντας υποξεία λοίμωξη με σημαντική απώλεια βάρους (>25%, ημέρα 5) και με 10-30% θνητότητα κατά τις 14 ημέρες παρακολούθησης (Εικόνα 14). Το συγκεκριμένο μοντέλο μιμείται τα ποσοστά θνητότητας ανάλογων λοιμώξεων σε ανθρώπους (26).



Εικόνα 14: Καθιέρωση του πειραματικού μοντέλου ποντικών. Η επιβίωση των ποντικών που μολύνθηκαν με τα 3 διαφορετικά στελέχη *C. parapsilosis* και δεν έλαβαν καμία θεραπεία [CAS-S (1.3×10^8 βλαστοσπόρια/ποντίκι, $n = 20$ ποντίκια, 2 ανεξάρτητα πειράματα και 1.8×10^8 βλαστοσπόρια/ποντίκι, $n = 12$ ποντίκια, 2 ανεξάρτητα πειράματα), CAS-I (1.8×10^8 βλαστοσπόρια/ποντίκι, $n = 18$ ποντίκια, 2 ανεξάρτητα πειράματα) and CAS-R (1.8×10^8 βλαστοσπόρια/ποντίκι, $n = 10$ ποντίκια, 2 ανεξάρτητα πειράματα)]. CAS: Κασποφουγκίνη, S: Ευαίσθητο, R: Ανθεκτικό, I: Ενδιάμεσης αντοχής.

Παρόλο τα χαμηλά ποσοστά θνητότητας, η λοίμωξη με την συγκεκριμένη ποσότητα και η μέτρηση του μυκητικού φορτίου στα όργανα των ζώων απέδειξε πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη και των τριών στελεχών *C. parapsilosis* σε όλα τα όργανα-στόχους, που χαρακτηρίζεται από αύξηση στο μυκητικό φορτίο και παθολογοανατομική ένδειξη του μύκητα (Εικόνα 15). Ειδικά, η κινητική του μυκητικού φορτίου, μέσω του υπολογισμού του αριθμού των αποικιών/γραμμάριο ιστού έδειξε ότι το μέγιστο φορτίο παρατηρείται την 2^η ημέρα μετά την μόλυνση και σχετικά γρήγορη και σημαντική κάθαρση των οργάνων από τις άμυνες του ξενιστή την 3^η ημέρα μετά την μόλυνση (Εικόνα 15).

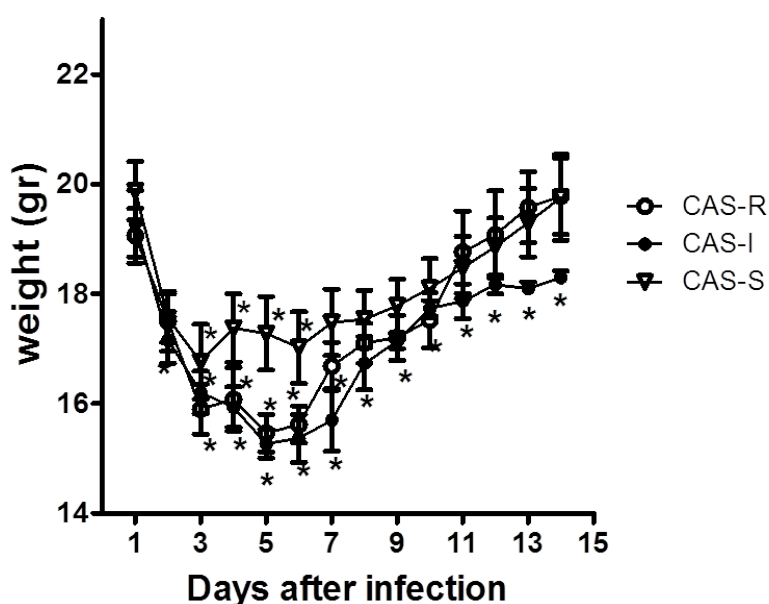


Εικόνα 15. Κινητική του μυκητικού φορτίου στα διάφορα όργανα-στόχους, που υποδηλώνει πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη της *C. parapsilosis*, φτάνοντας στο μέγιστο φορτίο την 2^η ημέρα μετά την μόλυνση και ακολουθεί γρήγορη κάθαρση του μύκητα από τον ξενιστή την 3^η ημέρα μετά την μόλυνση. Η κινητική του μυκητικού φορτίου (log CFU/γραμμάριο ιστού οργάνου) στα διάφορα όργανα (σπλήνας, ήπαρ, νεφροί) σε ποντίκια που δεν έλαβαν καμία θεραπεία και μολύνθηκαν με το a) CAS-S, b) CAS-I and c) CAS-R στέλεχος *C. parapsilosis* (n= 3 ποντίκια για κάθε χρονικό σημείο, 1 ανεξάρτητο πείραμα).

Επιπρόσθετα, η μέτρηση της απώλειας βάρους των ποντικών που μολύνθηκαν με τα 3 διαφορετικά στελέχη, που αποτελεί έναν ήδη καθιερωμένο δείκτη σοβαρότητας της νόσου σε μοντέλα καντιντίασης από *C. albicans* (143,155,156), συσχετίστηκε με την πρόοδο της νόσου στο δικό μας μοντέλο

καντιντίασης από *C. parapsilosis*. Όλα τα ποντίκια που μολύνθηκαν έχασαν > 25% του αρχικού τους βάρους έως την 5^η ημέρα μετά την μόλυνση ($p < 0.05$).

Τα παραπάνω αποτελούν ένδειξη ότι τα μολυσμένα ποντίκια που δεν έχουν λάβει θεραπεία πάσχουν από υψηλό ποσοστό νοσηρότητας και σοβαρότητας της νόσου, με την ανάκαμψη να αρχίζει να παρατηρείται την 6^η ημέρα μετά την μόλυνση (Εικόνα 16). Έτσι, καθιερώθηκε ένα πειραματικό μοντέλο ποντικών με διάχυτη καντιντίαση από *C. parapsilosis*.



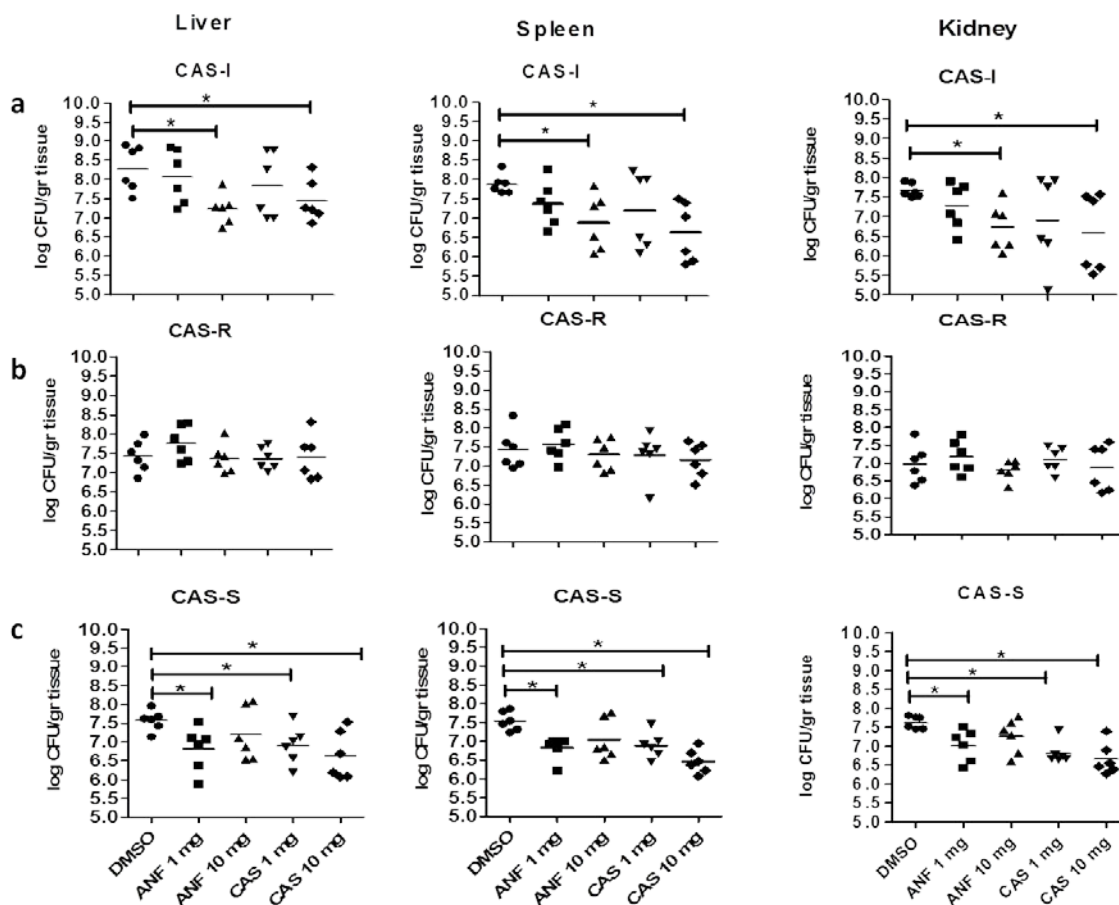
Εικόνα 16: Καθιέρωση του πειραματικού μοντέλου ποντικών. Η απώλεια βάρους των ποντικών που μολύνθηκαν με τα 3 διαφορετικά στελέχη *C. parapsilosis* και δεν έλαβαν καμία θεραπεία ($n = 5$ ποντίκια για κάθε ομάδα, 1 ανεξάρτητο πείραμα). Οι κάθετες μπάρες αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση (SD). * P (διαφορές στο βάρος σε σύγκριση με την ημέρα 0) < 0.05 . Χρησιμοποιήθηκε ως στατιστική μέθοδος το ANOVA with Dunnett's post test για πολλαπλές συγκρίσεις. CAS: Κασποφουγκίνη, S: Ευαίσθητο, R: Ανθεκτικό, I: Ενδιάμεσης αντοχής.

Το στέλεχος *C. parapsilosis* που είναι ευαίσθητο στην κασποφουγκίνη (CAS-S) είναι πιο λοιμογόνο σε σύγκριση με τα στελέχη *C. parapsilosis* που παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία στην κασποφουγκίνη στο μοντέλο ποντικών

Μετά την καθιέρωση του μοντέλου ποντικών με διάχυτη καντιντίαση από *C. parapsilosis*, συγκρίθηκε η λοιμογόνος δύναμη (virulence) των τριών διαφορετικών στελεχών *C. parapsilosis* στο μοντέλο με διαφορετικού βαθμού ευαισθησία στην κασποφουγκίνη. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα τρία στελέχη *C. parapsilosis* διέφεραν σημαντικά, όσον αφορά την λοιμογόνο δύναμή τους και της επιθετικότητά τους. Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος που ήταν ευαίσθητο στην κασποφουγκίνη (CAS-S) ήταν πιο επιθετικό σε σχέση με τα άλλα δύο στελέχη, με ποσοστό θνητότητας έως 100% ($P < 0.001$) (Εικόνα 14). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι το στέλεχος που ήταν ανθεκτικό στην κασποφουγκίνη (CAS-R) είχε εξασθενημένη λοιμογόνο δράση και ήταν λιγότερο επιθετικό σε σχέση με το στέλεχος που είχε χαμηλού βαθμού αντοχή στην κασποφουγκίνη (CAS-I), με μία τάση προς μειωμένη θνητότητα (ποσοστά θνητότητας: 11.1% vs 0%, $P = 0.45$).

Οι εχिनοκανδίνες κατέχουν σημαντική δραστηριότητα έναντι στελεχών *C. parapsilosis* που παρουσιάζουν ευαισθησία ή ενδιάμεση αντοχή στην κασποφουγκίνη (CAS-S και CAS-I στελέχη) *in vivo*

Στην συνέχεια, μελετήθηκε η *in vivo* δραστηριότητα της κασποφουγκίνης και της ανιντουλαφουγκίνης έναντι των 3 γνωστών στελεχών *C. parapsilosis* ευαίσθητων στην ανιντουλαφουγκίνη και με διαφορετικού βαθμού αντοχή στην κασποφουγκίνη. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν δύο φορές για την υψηλότερη εγκυρότητα των αποτελεσμάτων.



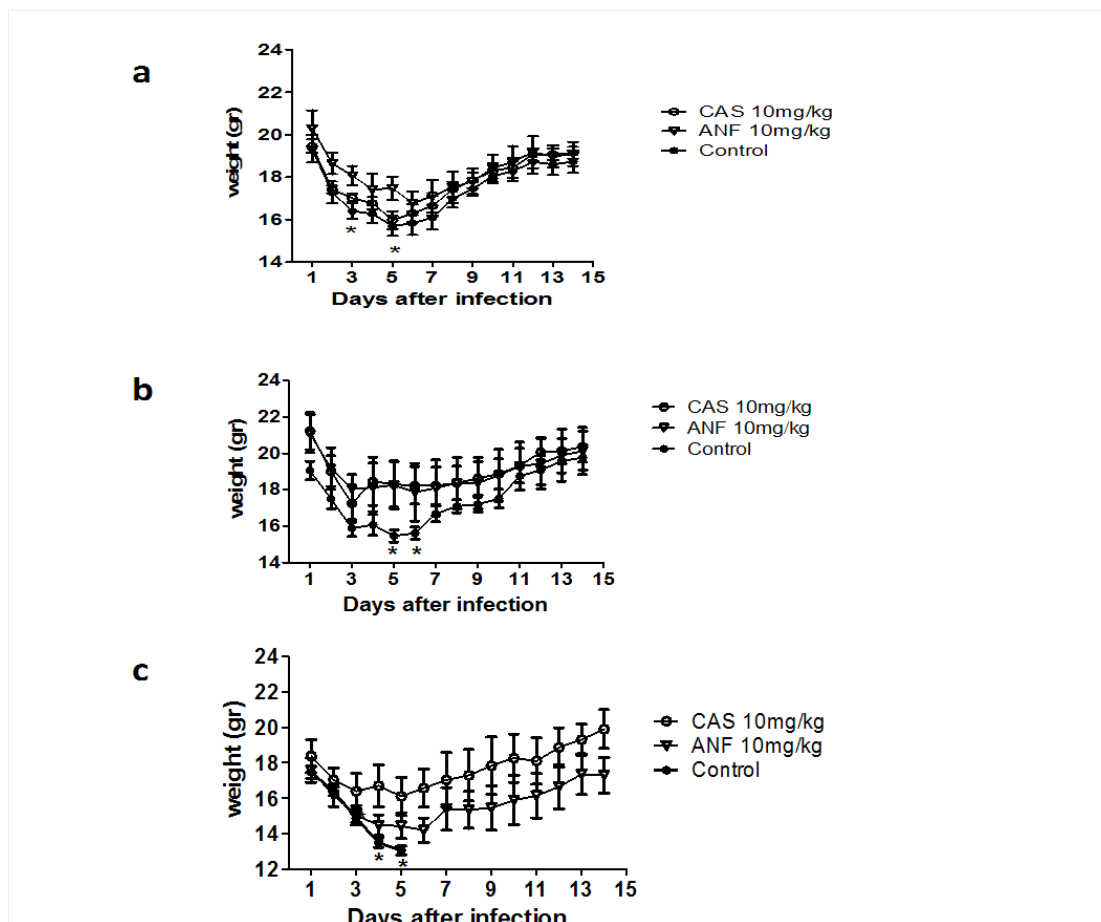
Εικόνα 17. Η θεραπεία με τις εχινοκανδίνες σχετίζεται με σημαντική μείωση του μυκητικού φορτίου των ιστών στα ποντίκια που μολύνθηκαν με τα στελέχη *C. parapsilosis* CAS-S και CAS-I. Το μυκητικό φορτίο (log CFU/γραμμάριο ιστού οργάνου) στα διάφορα όργανα (σπήνας, ήπαρ, νεφροί) των ποντικών την 2^η ημέρα μετά την μόλυνση με CAS-I (a), CAS-R (b) ή CAS-S στέλεχος *C. parapsilosis* (c) και θεραπεύτηκαν είτε με DMSO (control) είτε με διαφορετικές δόσεις εχινοκανδινών (CAS, ANF). Έξι ποντίκια χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε ομάδα ποντικών (n = 6 ποντίκια x 5 ομάδες, 30 ποντίκια συνολικά). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν ως ο μέσος όρος του μυκητικού φορτίου \pm τυπική απόκλιση σε δύο ανεξάρτητα πειράματα. Το κάθε σύμβολο αντιπροσωπεύει ένα ανεξάρτητο πείραμα και οι οριζόντιες μπάρες το μέσο όρο. * P control vs ομάδες θεραπείας < 0.05. Χρησιμοποιήθηκε ως στατιστική μέθοδος το ANOVA with Dunnett's post test για πολλαπλές συγκρίσεις. CAS: Κασποφουγκίνη, S: Ευαίσθητο, R: Ανθεκτικό, I: Ενδιάμεσης αντοχής. Οι οριζόντιες μπάρες δείχνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα controls και τις ομάδες θεραπείας.

Συγκρίθηκε, λοιπόν, η *in vivo* δραστηριότητα της κασποφουγκίνης και της ανιντουλαφουγκίνης έναντι των στελεχών CAS-S και CAS-I στο συγκεκριμένο μοντέλο ποντικών διάχυτης καντιντίασης. Όταν τα ποντίκια μολύνθηκαν με την

ενδιάμεσης αντοχής στην κασποφουγκίνη *C. parapsilosis*, και οι δύο εχινικανδίνες ανέδειξαν παρόμοια και σημαντική δραστηριότητα, όπως αποδείχτηκε από την μεγάλη κάθαρση του μυκητικού φορτίου σε όλα τα όργανα-στόχους [νεφρός: μείωση μυκητικού φορτίου, log CFU/gr (vs μάρτυρες) για 10mg/kg/ημέρα κασποφουγκίνη (mean \pm SD); 1.091 \pm 0.417, P = 0.026; 10mg/kg/ημέρα ανιντουλαφουγκίνη 0.943 \pm 0.256, P = 0.004] (Εικόνα 17a). Η κάθαρση ήταν πιο έντονη και εμφανής στα ποντίκια που έλαβαν υψηλές δόσεις φαρμάκων έναντι αυτών που πήραν χαμηλές, όπου η κάθαρση του μυκητικού φορτίου ήταν μικρότερη. Όταν χορηγήθηκαν υψηλές δόσεις εχινικανδινών στα ποντίκια παρατηρήθηκε μία μείωση στην σοβαρότητα της νόσου, σε σχέση με τα ποντίκια που δεν έλαβαν καμία θεραπεία, όπως αυτή εκφράζεται μέσω της μέτρησης της μέσης απώλειας βάρους των ποντικών [μέγιστη μέση απώλεια βάρους την 5^η ημέρα θεραπείας για 10mg/kg/ημέρα κασποφουγκίνη vs μάρτυρες: mean \pm SD; 14.7% \pm 2.0%, P = 0.09, 10mg/kg/ημέρα ανιντουλαφουγκίνη vs μάρτυρες, 13.1% \pm 12.3%, P = 0.02] (Εικόνα 18a).

Όταν τα ποντίκια μολύνθηκαν με το στέλεχος που ήταν ευαίσθητο στην κασποφουγκίνη, παρατηρήθηκε μείωση στο μυκητικό φορτίο σε όλα τα όργανα μετά από την χορήγηση κασποφουγκίνης ή χαμηλής δόσης ανιντουλαφουγκίνης σε σχέση με τα ποντίκια που δεν έλαβαν θεραπεία. Ωστόσο, ένα παράδοξο φαινόμενο παρατηρήθηκε στο μυκητικό φορτίο των οργάνων των ποντικών που έλαβαν υψηλές δόσεις ανιντουλαφουγκίνης, που φαίνεται να ποικίλλει ανάλογα με το είδος της εχινικανδίνης και τον τύπο της λοίμωξης. Πιο αναλυτικά, το μυκητικό φορτίο στα όργανα των ποντικών που δεν έλαβαν καμία θεραπεία ήταν σημαντικά υψηλότερο σε σχέση με τα ποντίκια που έλαβαν 10mg/kg/ημέρα κασποφουγκίνη ή

1mg/kg/ημέρα ανιντουλαφουγκίνη [νεφρός: μείωση μυκητικού φορτίου, log CFU/gr (vs μάρτυρες) για 10mg/kg/ημέρα κασποφουγκίνης (mean \pm SD); 0.959 \pm 0.183, P = 0,0004; 1mg/kg/ημέρα ανιντουλαφουγκίνης 0.601 \pm 0.185, P = 0.008] (Εικόνα 17c).



Εικόνα 18. Η απώλεια βάρους ήταν μικρότερη στα ποντίκια που μολύνθηκαν και θεραπεύτηκαν με CAS ή ANF στην διάχυτη καντιντίαση που προκαλείται από τα τρία στελέχη *C. parapsilosis*. Η μέτρηση της απώλειας βάρους στα ποντίκια που θεραπεύτηκαν με εχινοκανδίνες (CAS, ANF) ή DMSO (Control) και μολύνθηκαν με το a) CAS-I, b) CAS-R και c) CAS-S στέλεχος *C. parapsilosis* (n= 5 ποντίκια ανά ομάδα, 1 ανεξάρτητο πείραμα). Οι κάθετες μπάρες αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση (SD). * P control vs ομάδες θεραπείας < 0.05. Χρησιμοποιήθηκε ως στατιστική μέθοδος το ANOVA with Dunnett's post test για πολλαπλές συγκρίσεις. CAS: Κασποφουγκίνη, S: Ευαίσθητο, R: Ανθεκτικό, I: Ενδιάμεσης αντοχής.

Αντίθετα, τα ποντίκια, που θεραπεύτηκαν με 10mg/kg/ημέρα ανιντουλαφουγκίνης, δεν παρουσίασαν καμία σημαντική μείωση στο μυκητικό φορτίο σε σχέση με τα ποντίκια που δεν έλαβαν θεραπεία [νεφρός: μείωση

μυκητικού φορτίου, log CFU/gr (vs μάρτυρες) για 10mg/kg/ημέρα ανιντουλαφουγκίνης (mean±/ SD); 0.364 ±0.339, P =0.096] (Εικόνα 17c). Η απώλεια βάρους ήταν μικρότερη στα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία, είτε κασποφουγκίνη, είτε ανιντουλαφουγκίνη, ενώ όλα τα ποντίκια που δεν έλαβαν καμία θεραπεία έχασαν σημαντικό βάρος και πέθαναν την 5^η ημέρα μετά την μόλυνση με το συγκεκριμένο στέλεχος *C. parapsilosis* (Εικόνα 18c).

Το παράδοξο φαινόμενο που παρατηρήθηκε στις υψηλές δόσεις της ANF στα ποντίκια που μολύνθηκαν με το στέλεχος CAS-S *C. parapsilosis* επιβεβαιώθηκε σε ένα επιπρόσθετο πείραμα (τα δεδομένα δεν φαίνονται). Υπήρξε μία σημαντική ποικιλία στο μυκητικό φορτίο των οργάνων στα ποντίκια που μολύνθηκαν με το CAS-I *C. parapsilosis* στέλεχος και θεραπεύτηκαν με CAS, γεγονός το οποίο αποκλείει την δυνατότητα εκτίμησης του παράδοξου φαινομένου που σχετίζεται με την κασποφουγκίνη σε αυτό το ιδιαίτερο πειραματικό μοντέλο.

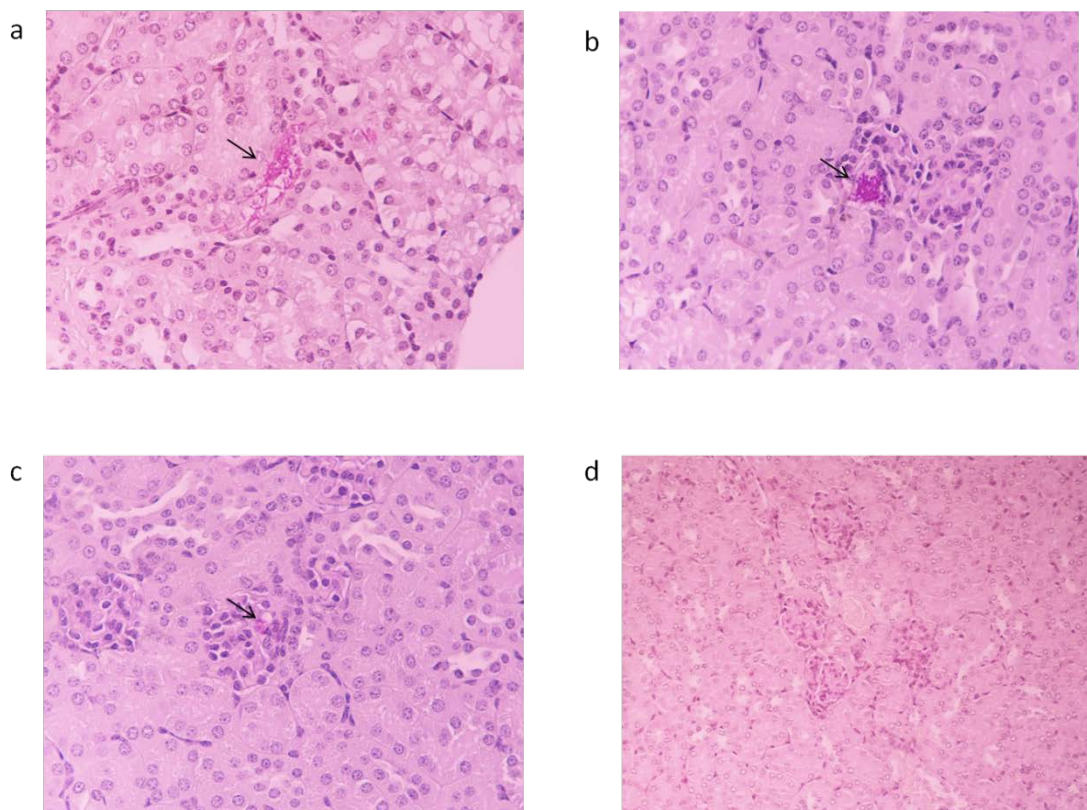
Η θεραπεία είτε με την CAS είτε με την ANF είναι λιγότερο αποτελεσματική έναντι του στελέχους *C. parapsilosis* που είναι ανθεκτικό στην CAS (CAS-R στέλεχος)

Αντίθετα, όταν τα ποντίκια μολύνθηκαν με το στέλεχος *C. parapsilosis* που είναι ανθεκτικό στην κασποφουγκίνη, αλλά ευαίσθητο στην ανιντουλαφουγκίνη, δεν υπήρχε καμία σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 5 ομάδες θεραπείας, όσον αφορά την δράση των εχινοκανδινών έναντι του στελέχους αυτού. Πιο συγκεκριμένα, δεν υπήρξε καμία ένδειξη σημαντικής μείωσης του μυκητικού φορτίου την 2^η ημέρα μετά την μόλυνση, μετά από την θεραπεία με τους δύο αντιμυκητικούς παράγοντες σε όλες τις δόσεις (1mg/kg/ημέρα και 10mg/kg/ημέρα) (Εικόνα 17b). Ωστόσο, τα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με οποιαδήποτε

εχινοκανδίνη, είτε κασποφουγκίνη, είτε ανιντουλαφουγκίνη, και ιδιαίτερα στις υψηλές δόσεις, είχαν πιο γρήγορη ανάκαμψη και μειωμένη σοβαρότητα της λοίμωξης, σε σύγκριση πάντα με τα ποντίκια-μάρτυρες, που δεν έλαβαν καμία θεραπεία, παρά μόνο DMSO, όπως φαίνεται από την μέτρηση της μέσης απώλειας βάρους των ποντικών [μέγιστη μέση απώλεια βάρους την 5^η ημέρα θεραπείας για 10mg/kg/ημέρα κασποφουγκίνη vs μάρτυρες: (mean+/- SD); 10.4% +/- 4.4%, P = 0.044, 10mg/kg/ημέρα ανιντουλαφουγκίνη vs μάρτυρες 11.6% +/- 6.7%, P = 0.038] (Εικόνα 18b).

Παθολογοανατομική ανάλυση του μυκητικού φορτίου των ιστών των οργάνων των ποντικών με διάχυτη καντιντίαση

Οι ιστολογικές τομές των νεφρών απέδειξαν τις διαφορές στο μυκητικό φορτίο ανάμεσα στα τρία διαφορετικά στελέχη *C. parapsilosis* την 2^η ημέρα μετά την μόλυνση (Πίνακας 5) και τα αποτελέσματα ήταν σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων του μυκητικού φορτίου σε όλα τα όργανα στόχους των ποντικών που έλαβαν θεραπεία με εχινοκανδίνες ή δεν έλαβαν καμία θεραπεία. Οι τομές στα ποντίκια που δεν έλαβαν θεραπεία και μολύνθηκαν με οποιαδήποτε από τα τρία στελέχη *C. parapsilosis* έδειξαν την παρουσία μεγάλων και διάσπαρτων εστιών από βλαστοσπόρια, οι οποίες συχνά συνυπάρχουν με δομές ψευδοϋφών, στα σπειράματα των νεφρών, ενώ τα σωληνάκια παρέμεναν φυσιολογικά (Εικόνα 19a και 19b). Αντίθετα, στα ποντίκια που μολύνθηκαν με τα στελέχη CAS-I ή CAS-S και θεραπεύτηκαν με 10 mg/kg CAS ή 10mg/kg ANF, παρατηρήθηκε μία σημαντική μείωση ή απουσία των βλαστοσπορίων ή των ψευδοϋφών στις τομές των νεφρών των ποντικών (Εικόνα 19c και 19d).



Εικόνα 19. Αντιπροσωπευτικές τομές νεφρών με χρώση PAS (την 2^η ημέρα μετά την μόλυνση) από τα ποντίκια που μολύθηκαν με τα στελέχη *C. parapsilosis*. a) Τα σωληνάρια εμφανίζονται φυσιολογικά, ενώ τα βλαστοσπόρια και οι ψευδοϋφές είναι παρόντα στα σπειράματα των ποντικών που δεν έλαβαν θεραπεία. Πρότυπη μεγέθυνση x 400. b) Η παρουσία βλαστοσπορίων σε ένα σπείραμα των ποντικών που δεν έλαβαν θεραπεία ή θεραπεύτηκαν με εχινοκανδίνες (συνήθως σε μικρή δόση). Πρότυπη μεγέθυνση x 400. c) Λιγότερα βλαστοσπόρια ή μικρότερες εστίες βλαστοσπορίων σε ένα σπείραμα ποντικών που έλαβαν θεραπεία με εχινοκανδίνες. Πρότυπη μεγέθυνση x 400. d) Η απουσία βλαστοσπορίων ή ψευδοϋφών στις τομές νεφρών από ποντίκια που θεραπεύτηκαν με εχινοκανδίνες. Πρότυπη μεγέθυνση x 400. (n= 3 ποντίκια ανά ομάδα, 1 ανεξάρτητο πείραμα).

Ιδιαίτερα, στα ποντίκια που μολύνθηκαν με το CAS-S στέλεχος και θεραπεύτηκαν με χαμηλή δόση της ανιτουλαφουγκίνης, παρατηρήθηκαν λιγότερα βλαστοσπόρια στις τομές των νεφρών σε σύγκριση με εκείνες των μολυσμένων ποντικών με το CAS-S στέλεχος που έλαβαν θεραπεία με υψηλή δόση της ανιτουλαφουγκίνης. Όσον αφορά το CAS-R στέλεχος, οι τομές των νεφρών που

πραγματοποιήθηκαν στα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με εχινοκανδίνες, δεν απέδειξαν καμία σημαντική μείωση στον αριθμό των βλαστοσπορίων σε σύγκριση με τα ποντίκια που δεν έλαβαν καμία θεραπεία (Πίνακας 5). Οι διαφορές στο σκορ των παθολογοανατομικών ευρημάτων ανάμεσα στις διαφορετικές ομάδες θεραπείας φαίνονται στον Πίνακα 5.

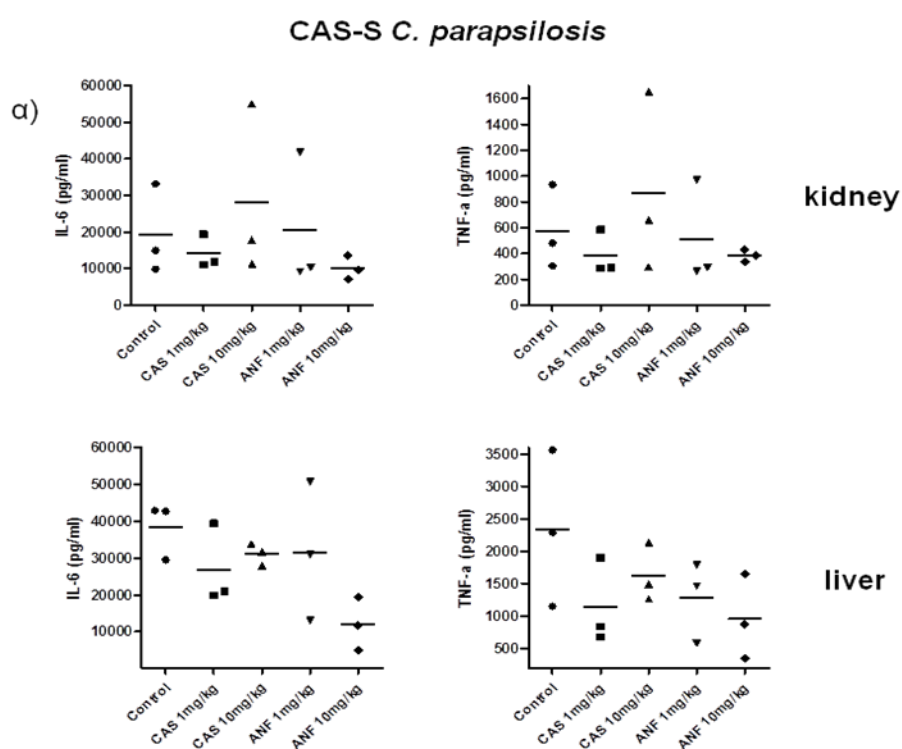
	Παθολογοανατομικά ευρήματα		
Ποντίκια	Στελέχη <i>Candida parapsilosis</i>		
	CAS-I στέλεχος	CAS-R στέλεχος	CAS-S στέλεχος
Control - Θεραπεία με DMSO	Βλαστοσπóρια (++) Ψευδοϋφές (+)	Βλαστοσπóρια (++) Ψευδοϋφές (-)	Βλαστοσπóρια (++) Ψευδοϋφές (-)
Θεραπεία με Κασποφουγκίνη (υψηλή δόση)	Βλαστοσπóρια (-) Ψευδοϋφές (-)	Βλαστοσπóρια (++) Ψευδοϋφές (-)	Βλαστοσπóρια (-) Ψευδοϋφές (-)
Θεραπεία με Ανιντουλαφουγκίνη (υψηλή δόση)	Βλαστοσπóρια (+) Ψευδοϋφές (+)	Βλαστοσπóρια (++) Ψευδοϋφές (-)	Βλαστοσπóρια (++) Ψευδοϋφές (-)

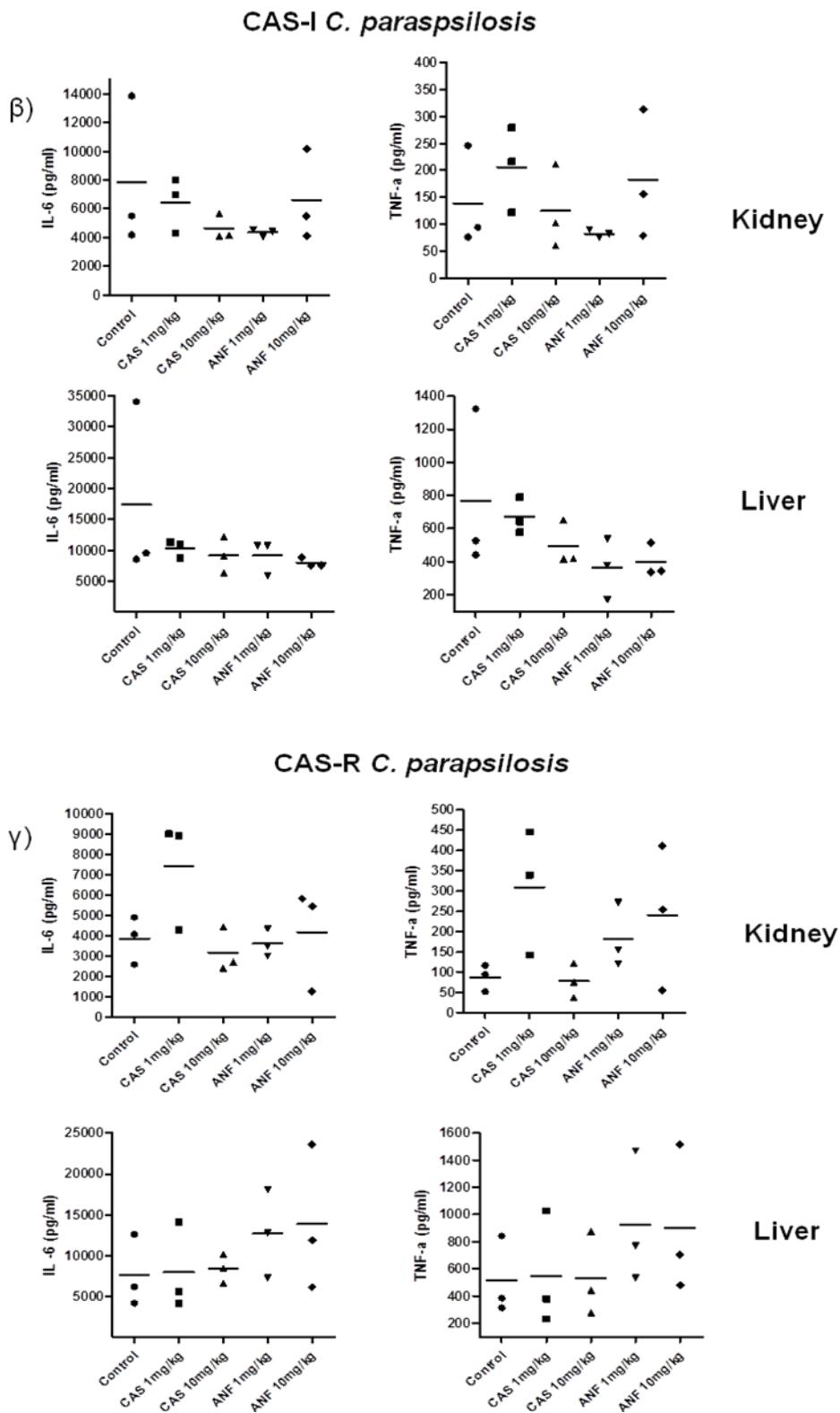
Πίνακας 5. Παθολογοανατομική ανάλυση του μυκητικού φορτίου των ιστών οργάνων. Οι διαφορές στο παθολογοανατομικό σκορ ανάμεσα στις διαφορετικές ομάδες θεραπείας, στους νεφρούς των ποντικών που μολύνθηκαν με τα τρία διαφορετικά στελέχη *C. parapsilosis*. Ο βαθμός των παθολογοανατομικών ευρημάτων καθορίστηκε από ένα σκορ που κυμαίνεται από (-) έως (++) . Για παράδειγμα, (-): απουσία των βλαστοσπορίων ή κάποιου σχηματισμού υφής (ψευδοϋφές) σε τομές νεφρών. (+): αραιά, διάσπαρτα βλαστοσπóρια (≤ 3 βλαστοσπóρια) ή/και λίγες εστίες βλαστοσπορίων ή ψευδοϋφών (<2 εστίες) στις τομές νεφρών. (++) : άφθονες (≥ 2 εστίες) ή/και μεγάλες (≥ 3 βλαστοσπóρια) εστίες βλαστοσπορίων ή ψευδοϋφών στις τομές νεφρών. CAS: Κασποφουγκίνη, S: Ευαίσθητο, R: Ανθεκτικό, I: Ενδιάμεσης αντοχής.

Προσδιορισμός της ποσότητας των κυτταροκινών (IL-6 και TNF-α) στα υπερκείμενα του ήπατος και του νεφρού σε ποντίκια που μολύνθηκαν με τα 3 στελέχη *C. parapsilosis* και θεραπεύτηκαν με εχινοκανδίνες ή DMSO.

Τέλος, προσδιορίσαμε το ποσό των κυτταροκινών (IL-6 και TNF-α) που εκκρίνεται στο υπερκείμενο του ήπατος και του νεφρού των ποντικών που μολύνθηκαν με τα 3 στελέχη *C. parapsilosis* και έλαβαν θεραπεία με εχινοκανδίνες (CAS, ANF) ή DMSO (control). Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 20.

Παρατηρήθηκε ότι όταν το μυκητικό φορτίο ήταν αυξημένο στα όργανα-στόχους των ποντικών που μολύνθηκαν με τα στελέχη CAS-S και CAS-I, η έκκριση των κυτταροκινών, επομένως και η ανοσολογική απάντηση, ήταν μεγαλύτερη. Όσον αφορά το στέλεχος CAS-R, όπου το μυκητικό φορτίο ήταν παρόμοιο σε όλες τις ομάδες θεραπείας και τα controls, τα ευρήματα είναι μη ειδικά και δεν καταλήγουν σε κάποιο συμπέρασμα.





Εικόνα 20. Προσδιορισμός της ποσότητας της IL-6 και TNF-α που εκκρίνονται στα υπερκείμενα του ήπατος και του νεφρού σε ποντίκια που μολύνθηκαν με α) *C. parapsilosis* CAS-S, β) *C. parapsilosis* CAS-I και γ) *C. parapsilosis* CAS-R και τα οποία θεραπεύτηκαν με εχινοκανδίνες (CAS, ANF) σε υψηλή και χαμηλή δόση και με DMSO (Control).

Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η επίπτωση της *C. parapsilosis* έχει αυξηθεί σημαντικά την τελευταία δεκαετία. Στην πραγματικότητα, η *C. parapsilosis* αποτελεί το δεύτερο πιο συχνό είδος *Candida* που απομονώνεται από τις καλλιέργειες αίματος και προκαλεί διηθητική καντιντίαση παγκοσμίως [3,35-37]. Η μυκηταιμία από *C. parapsilosis* μπορεί να οδηγήσει στην διασπορά του μύκητα στους ιστούς [66], προκαλώντας εν τω βάθει λοιμώξεις με σημαντικό ποσοστό θνητότητας [36,55,68].

Σε αυτή την μελέτη, καθιερώθηκε ένα επαναλήψιμο μοντέλο διάχυτης καντιντίασης από *C. parapsilosis* σε ανοσοεπαρκή ποντίκια. Αυτό το μοντέλο μιμείται την παθοβιολογία της συγκεκριμένης λοίμωξης στους ανθρώπους και επιτρέπει τις συγκρίσεις της δράσης των αντιμυκητικών φαρμάκων, η οποία βασίζεται στις διαφορές του μυκητικού φορτίου και της απώλειας βάρους στα μολυσμένα ποντίκια.

Σε προηγούμενα μοντέλα ποντικών με διάχυτη καντιντίαση από *C. parapsilosis*, έχει χρησιμοποιηθεί η χημειοθεραπεία για να επάγει την ουδετεροπενία στα ποντίκια ή η χορήγηση κορτικοστεροειδών με σκοπό την δημιουργία μιας λοίμωξης που μπορεί να αναπαραχθεί, πιθανώς, λόγω της εξασθενημένης λοιμογόνου δύναμης του μύκητα σε σύγκριση με άλλα είδη *Candida* [107,155,161-163]. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν ανοσοεπαρκή ποντίκια, επειδή στους ανθρώπους, αυτός ο τύπος λοίμωξης συμβαίνει πιο συχνά σε μη ουδετεροπενικούς ενήλικες και σε νεογνά, ιδιαίτερα σε ασθενείς που φέρουν για παρατεταμένο χρονικό διάστημα κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες, καθετήρες περιτοναϊκής διήθησης και συσκευές καθετηριασμού της ουροδόχου κύστης ή σε ασθενείς που λαμβάνουν παρεντερική διατροφή, λόγω της προσκόλλησης της *C.*

parapsilosis στα ξένα υλικά [65,101,144]. Αυτό το είδος *Candida* είναι επίσης, υπεύθυνο για επιδημίες στα νοσοκομεία που σχετίζονται με τα χέρια των επαγγελματιών υγείας, τα οποία αποτελούν την κύρια πηγή μόλυνσης [58,146,164,165].

Χρησιμοποιήθηκε, ειδικά, μία συγκέντρωση της *C. parapsilosis* που είχε ως αποτέλεσμα μία υποξεία λοίμωξη και σχετικά χαμηλή θνητότητα (10-30%), παρόμοια με την θνητότητα που έχει παρατηρηθεί στην λοίμωξη από *C. parapsilosis* στους ανθρώπους. Η θνητότητα της μυκηταιμίας που προκαλείται από την *C. parapsilosis* κυμαίνεται από 4% έως 45% [36,55,67,68]. Ο Trofa D. και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι η μέση θνητότητα της λοίμωξης από *C. parapsilosis* είναι περίπου 28.5%, σε σύγκριση με το 44.8% που παρατηρήθηκε στην λοίμωξη από *C. albicans*, επιβεβαιώνοντας την εξασθενημένη λοιμογόνο δύναμη της *C. parapsilosis* [65]. Λόγω των σχετικά χαμηλών ποσοστών θνητότητας που σχετίζονται με την μυκηταιμία από *C. parapsilosis* στους ανθρώπους, καθώς επίσης και στο συγκεκριμένο μοντέλο, εκτός από το ποσοστό θνητότητας εκτιμήθηκε και το μυκητικό φορτίο σε όλα τα όργανα-στόχους (CFU/gr), ως ένας ακριβής δείκτης της σοβαρότητας της νόσου.

Επιπρόσθετα, η απώλεια βάρους χρησιμοποιήθηκε ως ένας σύνθετος δείκτης νοσηρότητας, που εξαρτάται και από την λοιμογόνο δύναμη του μύκητα και από την φλεγμονώδη ανοσολογική απάντηση του ξενιστή. Αρκετές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει αυτόν τον δείκτη για την σοβαρότητα της νόσου στα ποντίκια με διάχυτη καντιντίαση ή άλλον τύπο λοίμωξης [147,159,160]. Ιδιαίτερα, η κάθαρση του μύκητα παρατηρήθηκε σχετικά νωρίς, στα ποντίκια που δεν έλαβαν καμία θεραπεία, μετά την λοίμωξη με *C. parapsilosis* στο συγκεκριμένο μοντέλο. Έτσι, ήταν

δύσκολο να εκτιμηθεί το θεραπευτικό αποτέλεσμα της αντιμυκητικής θεραπείας, με βάση μόνο την μέτρηση του μυκητικού φορτίου. Γι'αυτόν τον λόγο, χρησιμοποιήθηκε η μέτρηση της απώλειας βάρους, ως ένας άλλος δυναμικός δείκτης της αποτελεσματικότητας των αντιμυκητικών φαρμάκων, η οποία πραγματοποιούνταν σε καθημερινή βάση. Είναι εύλογο ότι οι διαφορές ανάμεσα στην απώλεια βάρους και την μείωση του μυκητικού φορτίου αντανακλούν τους περιορισμούς αυτού του μοντέλου ποντικών.

Επίσης, εκτιμήθηκε η *in vivo* δραστηριότητα της κασποφουγκίνης vs ανιντουλαφουγκίνης έναντι των 3 στελεχών *C. parapsilosis* που παρουσιάζουν διαφορετικού βαθμού ευαισθησία στην κασποφουγκίνη. Όσον αφορά το στέλεχος CAS-R, βρέθηκε ότι, αν και δεν υπήρχε καμία διαφορά στο μυκητικό φορτίο ανάμεσα στα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με εχινοκανδίνες και σε αυτά που δεν έλαβαν καμία θεραπεία, υπήρχε μικρότερη απώλεια βάρους και πιο γρήγορη απόκτηση βάρους στην πρώτη ομάδα. Όσον αφορά το στέλεχος CAS-I, μόνο οι υψηλές δόσεις είτε της κασποφουγκίνης, είτε της ανιντουλαφουγκίνης, ήταν αποτελεσματικές στην μείωση του μυκητικού φορτίου και μείωση της απώλειας βάρους σε σύγκριση με τα ποντίκια που δεν έλαβαν καμία θεραπεία. Τέλος, όσον αφορά το στέλεχος CAS-S, ήταν πιο επιθετικό σε σχέση με τα στελέχη CAS-I και CAS-R. Στην περίπτωση της λοίμωξης με το στέλεχος CAS-S, η θεραπεία είτε με κασποφουγκίνη, είτε με χαμηλή δόση ανιντουλαφουγκίνης, είχε ως αποτέλεσμα την μεγαλύτερη μείωση του μυκητικού φορτίου στα όργανα-στόχους σε σχέση με τα ποντίκια που δεν έλαβαν θεραπεία, ενώ οι ομάδες που θεραπεύτηκαν με εχινοκανδίνες ανέκτησαν πιο γρήγορα βάρος, συγκριτικά με τα ποντίκια που έλαβαν DMSO. Παρόμοια η συγκριτική δραστηριότητα της κασποφουγκίνης vs

ανιντουλαφουγκίνης, όπως αντανακλάται από το μυκητικό φορτίο (CFU/gr) και τον βαθμό της απώλειας βάρους, έδειξε ότι τα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με εχινοκανδίνες και μολύνθηκαν και με τα 3 στελέχη, ανέκτησαν πιο γρήγορα βάρος σε σχέση με τα ποντίκια που δεν έλαβαν θεραπεία.

Οι εχινοκανδίνες παρουσιάζουν μειωμένη *in vitro* δράση έναντι της *C. parapsilosis* [13,26,146-148] και έχει αναφερθεί πρόσφατα κλινική αποτυχία που οφείλεται στα στελέχη CAS-R [152,153], ιδιαίτερα σε ασθενείς που λαμβάνουν κασποφουγκίνη [101,108]. Η κλινική αντοχή είναι σχετικά σπάνια και έχουν αναφερθεί λίγες μόνο σποραδικές περιπτώσεις επιλοίμωξης (breakthrough λοιμώξεις) από μύκητες σε ασθενείς που ελάμβαναν θεραπεία με εχινοκανδίνες. Η παρουσία στελεχών από είδη που είναι ευαίσθητα στις εχινοκανδίνες που παραδόξως εμφανίζουν πολύ υψηλές τιμές MIC, καθώς και η παρουσία λιγότερο ευαίσθητων non-*albicans Candida spp.*, όπως η *C. parapsilosis*, τα οποία παρουσιάζουν τιμές MIC 4-100 φορές μεγαλύτερες σε σχέση με αυτές της *C. albicans*, αποτελούν δύο σημαντικά ευρήματα για την κλινική έκβαση, αφού αυτοί οι οργανισμοί ανταποκρίνονται στην θεραπεία με εχινοκανδίνες [117-119]. Ωστόσο, καθώς η έκθεση των ασθενών στις εχινοκανδίνες αυξάνεται, αναμένεται και ο αριθμός των στελεχών με αυξημένες τιμές MIC *in vitro* και με μειωμένη ευαισθησία στις εχινοκανδίνες να αυξηθεί, και ταυτόχρονα να αυξηθεί ο αριθμός των ασθενών με κλινική αποτυχία, λόγω της αντοχής στις εχινοκανδίνες. Δυστυχώς, η σχέση ανάμεσα στην μειωμένη *in vitro* ευαισθησία στις εχινοκανδίνες και στην κλινική αποτυχία είναι ασαφής, αφού οι υψηλές τιμές MIC δεν αποτελούν πάντα έναν αξιόπιστο δείκτη της έκβασης της θεραπείας [120,121].

Η μειωμένη ευαισθησία της *C. parapsilosis* στις εχινοκανδίνες έχει συσχετισθεί με κάποιους πολυμορφισμούς στο γονίδιο *FSK1* που κωδικοποιεί την κύρια υπομονάδα της συνθετάσης της γλυκάνης [144,112,166]. Οι μεταλλάξεις στο *Fks1 hot spot* εμποδίζουν την αναστολή της συνθετάσης της γλυκάνης, με αποτέλεσμα να απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση φαρμάκου για να επιτευχθεί η δράση του πάνω στην αναστολή του ενζύμου και να μειωθεί το μυκητικό φορτίο στους ιστούς [112,129,137]. Τα στελέχη *C. albicans* που παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία στην κασποφουγκίνη, παρουσιάζουν ταυτόχρονα και διασταυρούμενη αντοχή στην μिकाφουγκίνη και την ανιντουλαφουγκίνη, αποδεικνύοντας ότι ο μηχανισμός γενετικών αλλαγών στο *Fks1* αφορά όλες τις εχινοκανδίνες γενικά [112,129]. Ωστόσο, οι τιμές MIC είναι μεγαλύτερες για την μिकाφουγκίνη και την κασποφουγκίνη σε ένα Wild type στέλεχος με πλήρη ευαισθησία. Επομένως, οι τιμές MIC για την κασποφουγκίνη είναι 4->16μg/ml, για την μिकाφουγκίνη είναι 1-16μg/ml, ενώ η ανιντουλαφουγκίνη διατηρεί τις χαμηλές τιμές MIC στα 0.5-2μg/ml [112]. Τα στελέχη που είναι ανθεκτικά στις εχινοκανδίνες, είναι ευαίσθητα στις αζόλες και τα πολυένια, αποδεικνύοντας ότι αυτός ο μηχανισμός είναι ειδικός μόνο για τις εχινοκανδίνες [112].

Άλλες μελέτες έχουν προτείνει ότι οι διαφορές ανάμεσα στα διάφορα είδη σχετικά με την ευαισθησία στην κασποφουγκίνη, προκύπτουν από τον συνδυασμό των δομικών διαφορών στα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος, της μειωμένης συγγένειας με το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα της συνθετάσης της γλυκάνης ή των ποικιλιών στο ρυθμιστικό δίκτυο αυτού του συμπλέγματος [107,167]. Επίσης, το μοναδικό μιτοχονδριακό αναπνευστικό δίκτυο αυτού του είδους μύκητα μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην μειωμένη ευαισθησία του στις εχινοκανδίνες [168].

Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός αντοχής των *Candida spp.* στις εχινοκανδίνες μπορεί να προκύψει από τις γενετικές αλλαγές στα μονοπάτια που ρυθμίζουν την σύνθεση και την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα [112,129]. Οι εχινοκανδίνες δημιουργούν τεράστιο στρες στο κύτταρο, αναστέλλοντας την συνθετάση της γλυκάνης, με αποτέλεσμα την ελάττωση της γλυκάνης [126].

Επίσης, όπως έχει ήδη αναφερθεί, το κυτταρικό τοίχωμα του μύκητα είναι μία δυναμική δομή και η αναστολή της σύνθεσης ενός συστατικού του κυτταρικού τοιχώματος θα οδηγήσει σε αύξηση σύνθεσης ενός άλλου συστατικού [129]. Επομένως, η αναστολή της σύνθεσης της β-1,3-D-γλυκάνης από την δράση των εχινοκανδινών καταλήγει σε αντισταθμιστική αύξηση της παραγωγής της χιτίνης και αυτό έχει παρατηρηθεί στην *C. albicans* και σε άλλα είδη *Candida*. Η ενεργοποίηση της παραγωγής της χιτίνης πραγματοποιείται μέσω του μονοπατιού της πρωτεϊνικής κινάσης και αυτή η αύξηση της χιτίνης μπορεί να είναι υπεύθυνη για την μείωση της ευαισθησίας στις εχινοκανδίνες και να αποτελεί έναν πιθανό μηχανισμό αντοχής στις εχινοκανδίνες [129, 137, 138].

Η οδός της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) απαιτείται για την ανοχή στην κασποφουγκίνη και η έκφραση των γονιδίων της εξαρτάται από τον μεταγραφικό παράγοντα Rim1 [129]. Η καταστροφή του κυττάρου από την κασποφουγκίνη επάγει τους παράγοντες Wsc1 και Slt2, και την φωσφορορυλίωση της πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK), που με την σειρά τους προάγουν την προστατευτική απάντηση, ενεργοποιώντας την *de novo* σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, παράγοντας άλλους πολυσακχαρίτες, όπως είναι η χιτίνη [126,129]. Οπότε, η δημιουργία

μεταλλάξεων στα γονίδια που ρυθμίζουν την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος του μύκητα και η υπερέκφρασή τους, είναι πιθανόν να έχουν ως αποτέλεσμα την αντοχή των μυκήτων στις εχινοκανδίνες [129]. Επίσης, η αναστολή της σύνθεσης της β-1,3-D-γλυκάνης από την δράση των εχινοκανδινών καταλήγει σε αντισταθμιστική αύξηση της παραγωγής της χιτίνης και αυτό έχει παρατηρηθεί στην *C. albicans* και σε άλλα είδη *Candida* [129]. Η ενεργοποίηση της παραγωγής της χιτίνης πραγματοποιείται μέσω του μονοπατιού της πρωτεϊνικής κινάσης και αυτή η αύξηση της χιτίνης μπορεί να είναι υπεύθυνη για την μείωση της ευαισθησίας στις εχινοκανδίνες και να αποτελεί έναν πιθανό μηχανισμό αντοχής στις εχινοκανδίνες [129,138,139].

Ωστόσο, η έλλειψη ενός μοριακού μηχανισμού αντοχής των κλινικών στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, αποτελεί έναν περιορισμό της. Η καλύτερη διαχείριση των λοιμώξεων που προκαλούνται από στελέχη CAS-R *C. parapsilosis* δεν είναι ακόμα ξεκάθαρη. Διάφορες *in vitro* μελέτες απέδειξαν ότι υπάρχουν διαφορές όσον αφορά την δραστηριότητα των εχινοκανδινών έναντι της *C. parapsilosis* και ότι η ανιντουλαφουγκίνη διατηρεί την *in vitro* δράση της κατά των περισσότερων στελεχών που είναι ανθεκτικά στην κασποφουγκίνη [121,154,155]. Στην παρούσα μελέτη, όμως, αποδείχτηκε ότι η κασποφουγκίνη και η ανιντουλαφουγκίνη παρουσιάζουν παρόμοια δράση κατά των λοιμώξεων που προκαλούνται από όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν.

Επιπλέον, μία αύξηση στην επίπτωση των λοιμώξεων από *C. parapsilosis*, οι οποίες εν μέρει οφείλονται στην αυξημένη χρήση της κασποφουγκίνης, έχει αναφερθεί σε ορισμένα ογκολογικά κέντρα και σε ΜΕΘ [101,108]. Συνεπώς, η ανάδυση των στελεχών *C. parapsilosis* που παρουσιάζουν αντοχή στις

εχινοκανδίνες, σε συνδυασμό με την ανάγκη για έγκαιρη και κατάλληλη αντιμυκητική θεραπεία σε υψηλού κινδύνου ασθενείς για διάχυτη καντιντίαση προκαλεί ανησυχία για την όσο το δυνατόν καλύτερη διαχείριση των λοιμώξεων αυτών.

Ένα ενδιαφέρον εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν η παρατήρηση ενός παράδοξου φαινομένου που σχετίζεται με τις υψηλές δόσεις της ανιντουλαφουγκίνης, όταν τα ποντίκια μολύνονταν με το στέλεχος CAS-S, και φαίνεται να διαφέρει ανάλογα με το είδος της εχινοκανδίνης και το σημείο λοίμωξης. Αρκετές μελέτες έχουν περιγράψει το παράδοξο φαινόμενο για άλλες εχινοκανδίνες, και ιδιαίτερα για την κασποφουγκίνη [110,141,169-171]. Η παράδοξη ανάπτυξη δεν σχετίζεται με μεταλλάξεις στο Fks1 ή σε τροποποίηση της ευαισθησίας του συμπλέγματος της συνθετάσης της γλυκάνης στις εχινοκανδίνες [141]. Μία βιοχημική ανάλυση του κυτταρικού τοιχώματος ενός στελέχους *C. albicans*, στο οποίο παρατηρήθηκε παράδοξη ανάπτυξη, απέδειξε μία τεράστια αύξηση 898% στην ποσότητα της χιτίνης, εις βάρος των β-1,3 γλυκάνης και β-1,6 γλυκάνης, όπου παρατηρήθηκε μείωση μετά την δράση της κασποφουγκίνης [142].

Η *in vivo* σημασία του παράδοξου φαινομένου παραμένει άγνωστη, αφού τα επίπεδα φαρμάκου που απαιτούνται είναι υπερβολικά υψηλότερα από τις συνηθισμένες δόσεις των φαρμάκων που χορηγούνται, ωστόσο είναι σημαντικό να τονιστεί η ανάγκη για την ανακάλυψη άλλων μηχανισμών αντοχής, όπως είναι η ενεργοποίηση της σύνθεσης της χιτίνης [112]. Ωστόσο, είναι η πρώτη φορά που ένα παράδοξο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί στην θεραπεία των *in vivo* λοιμώξεων που προκαλούνται από *C. parapsilosis* με ανιντουλαφουγκίνη. Ένα παρόμοιο φαινόμενο έχει περιγραφεί για τα βακτηριοστατικά αντιμικροβιακά [174]. Επομένως, αυτά τα

δεδομένα προτείνουν ότι μερικά φάρμακα, όπως η ανιντουλαφουγκίνη, μπορεί να μην βρίσκονται σε συνέργεια με το ανοσοποιητικό σύστημα και να μην είναι δραστικά, ώστε να επιτευχθεί μυκητοκτόνος δράση.

Οι κλινικές επιπτώσεις της διαφορετικής δράσης των εχινοκανδινών έναντι της *C. parapsilosis* δεν είναι ακόμα γνωστές, καθώς δεν υπάρχουν συγκριτικές *in vivo* μελέτες. Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι στην περίπτωση της λοίμωξης με το CAS-R στέλεχος, δεν υπήρχε καμία διαφορά ανάμεσα στις ομάδες θεραπείας και την ομάδα ελέγχου, όσον αφορά την δράση έναντι της *C. parapsilosis*, όπως αποδείχτηκε από την εκτίμηση του μυκητικού φορτίου, αλλά υπήρχε διαφορά στην απώλεια βάρους και τη νοσηρότητα ανάμεσα στις 5 ομάδες, με αποτέλεσμα οι εχινοκανδίνες να θεωρούνται πιο αποτελεσματικές. Επίσης, το CAS-R στέλεχος παρουσίαζε μειωμένη λοιμογόνο δύναμη, σε σύγκριση με τα άλλα δύο στελέχη (CAS-I και CAS-S) (ποσοστά θνητότητας 0% vs 11.1% vs 30%, αντίστοιχα). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι οι εχινοκανδίνες έχουν μοναδικές ανοσορυθμιστικές ιδιότητες που πραγματοποιούνται μέσω της έκθεσης της β-γλυκάνης [108]. Είναι εύλογο, λοιπόν, ότι οι διαφορές στην *in vitro* δραστηριότητα των εχινοκανδινών έναντι των διάφορων ειδών *Candida* μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές αλλαγές στην ανοσολογική απάντηση του ξενιστή κατά των μυκήτων *in vivo*. Από την άλλη μεριά, η έκθεση της β-γλυκάνης ακολουθεί συνήθως την έκθεση της *Candida* σε συγκεντρώσεις των εχινοκανδινών μικρότερες από την MIC [108]. Τέλος, ο Andes και οι συνεργάτες του, ανέφεραν ότι οι φαρμακοδυναμικοί στόχοι των εχινοκανδινών (AUC:MICs) (AUC-Area Under the Curve) που σχετίζονται

με την κάθαρση της *C. parapsilosis* από τους νεφρούς σε ένα ουδετεροπενικό μοντέλο λοίμωξης, μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το είδος της εχινοκανδίνης και το είδος του στελέχους, αλλά γενικά, είναι χαμηλότεροι από τους στόχους AUC:MIC που απαιτούνται για την κάθαρση της *C. albicans* [133]. Ως εκ τούτου, ο βαθμός της διασταυρούμενης αντοχής που παρατηρήθηκε ανάμεσα στις διάφορες εχινοκανδίνες και την σχετική τιμή MIC μπορεί να ποικίλλει σημαντικά ανάμεσα στα διάφορα είδη *Candida*.

Γενικά, οι αλληλεπιδράσεις ξενιστή-παθογόνου είναι ένα περίπλοκο και δυναμικό φαινόμενο και εξαρτάται από πολλαπλούς παράγοντες που καθορίζουν το αποτέλεσμα της λοίμωξης. Και ο ξενιστής και το παθογόνο μπορούν να μειώσουν το fitness cost μέσω των μηχανισμών αντοχής που μειώνουν την άμεση καταστροφή των ιστών από τα παθογόνα. Έτσι, η ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη προστατευτικών μηχανισμών που δεν καταλήγουν σε θάνατο του παθογόνου, αλλά αντίθετα, έχουν ως αποτέλεσμα την ανοχή του παθογόνου στην ανοσία [134].

Επιπρόσθετα, αν και απαιτείται κάποιος βαθμός φλεγμονής για την προστασία, η συνεχής φλεγμονή επιδεινώνει τη νόσο και εμποδίζει την εκρίζωση του παθογόνου, αποδεικνύοντας μία διπλή φύση της φλεγμονώδους διαδικασίας κατά του μύκητα [135,175]. Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που υπαινίσσεται ότι οι αντιμυκητικές ιδιότητες των εχινοκανδινών θα μπορούσε να πραγματοποιούνται σε κάποιο βαθμό μέσω της επαγωγής της ανοσολογικής ανοχής κατά της *Candida* από τον ξενιστή.

Συμπέρασμα

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υπογραμμίζουν την διαφορά ανάμεσα στην εκτίμηση του μυκητικού φορτίου και την απώλεια βάρους-νοσηρότητα στο πειραματικό μοντέλο λοίμωξης από CAS-R *C. parapsilosis*. Πιο συγκεκριμένα, η θεραπεία με εχινοκανδίνες είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της νοσηρότητας, παρόλο που δεν παρατηρήθηκε μείωση στο μυκητικό φορτίο των ιστών. Επίσης, το στέλεχος που δεν ήταν ευαίσθητο στην CAS παρουσίαζε μειωμένη επιθετικότητα σε σχέση με το στέλεχος που ήταν ευαίσθητο στην CAS. Η αλλαγή στην βιοσύνθεση της χιτίνης του κυτταρικού τοιχώματος, που έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή των αλληλεπιδράσεων γλυκάνης και υποδοχέα του ανοσοποιητικού του ξενιστή, μπορεί να είναι υπεύθυνη γι'αυτές τις διαφορές [176]. Τέλος, ένα ενδιαφέρον εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν η παρατήρηση ενός παράδοξου φαινομένου που φαίνεται να διαφέρει ανάλογα με το είδος της εχινοκανδίνης και το σημείο λοίμωξης.

Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας δείχνουν ότι δεν υπάρχει καμία άμεση *in vitro/in vivo* συσχέτιση της δράσης των εχινοκανδινών έναντι της *C. parapsilosis* που παρουσιάζει αντοχή στην κασποφουγκίνη. Ειδικοί δείκτες της ανταπόκρισης στην θεραπεία με εχινοκανδίνες, οι οποίοι περιλαμβάνουν δείκτες νοσηρότητας (μυκητικό φορτίο των οργάνων vs απώλεια βάρους), έδειξαν περιορισμένη συμφωνία με την *in vitro* ευαισθησία. Ένα σύμπλεγμα της φαρμακοκινητικής [133], της σχετικής δραστηριότητας των εχινοκανδινών [133], της απώλειας fitness [177], του παράδοξου φαινομένου και των ανοσοτροποποιητικών αποτελεσμάτων [178], που μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με το σημείο της λοίμωξης, μπορεί να απαντάται *in vivo*, κατά την διάρκεια λοίμωξης από στελέχη *C. parapsilosis*, που

είναι ανθεκτικά στην κασποφουγκίνη. Περισσότερες μελέτες είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν σχετικά με την σύγκριση της λοίμωξης από *C. parapsilosis* με την λοίμωξη που προκαλείται από στελέχη *C. albicans* με διαφορετικού βαθμού ευαισθησία στις εχινοκανδίνες. Η πραγματοποίηση πειραμάτων με μοντέλα ανοσοκατεσταλμένων ποντικών ή μοντέλων με καθετήρα που σχετίζονται με μυκηταιμία από *C. parapsilosis* θα μπορούσε επίσης να προσφέρει επιπλέον πληροφορίες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Bennett J, Kullberg BJ. Deeply invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* 2002;16:821-35.
2. Fridkin, S. K. The changing face of fungal infections in health care settings. *Clin. Infect. Dis.* 2005;41:1455–1460.
3. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ *et al.*; SENTRY Participant Group. 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* 2001;39:3254-9.
4. Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Ruef C, Garbino J *et al.*; Fungal Infection Network of Switzerland. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clin Infect Dis* 2004;38:311-20.
5. Wisplinghoff, H., T. Bischoff, S. M. Tallent, H. Seifert, R. P. Wenzel, and M. B. Edmond. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* 2004;39:309–317.
6. Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari MP, Rosso R *et al.* Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis* 2006;6:21.
7. Segal, B. H., J. Kwon-Chung, T. J. Walsh, B. S. Klein, M. Batiwalla, N. G. Almyroudi, S. M. Holland, and L. Romani. Immunotherapy for fungal infections. *Clin. Infect. Dis.* 2006;42:507–515.

8. Nucci, M., and K. A. Marr. Emerging fungal diseases. *Clin. Infect. Dis.* 2005;41:521–526.
9. Spellberg BJ, Filler SG, Edwards JE Jr. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis.* 2006;42(2):244-51.
10. Rodloff A.C., Koch D. and Schaumann. Epidemiology and antifungal resistance in invasive candidiasis. *Eur J Med Res.* 2011;16:187-195.
11. Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W *et al.*; NIAID Mycoses Study Group. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis* 2003;37:634-43.
12. Snyderman DR. Shifting patterns in the epidemiology of nosocomial *Candida* infections. *Chest* 2003;123:500S-503S.
13. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):133-63.
14. De Rosa FG, Garazzino S, Pasero D, Di Perri G, Ranieri VM. Invasive candidiasis and candidemia: new guidelines. *Minerva Anesthesiol.* 2009;75(7-8):453-8.
15. Herbrecht R, Fluckiger U, Gachot B, Ribaud P, Thiebaut A, Cordonnier C. Treatment of invasive *Candida* and invasive *Aspergillus* infections in adult haematological patients. *Eur J Cancer Suppl* 2007;5:49-59.
16. M27-a3, Reference Method for Broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard - third Edition 2008, clinical and laboratory standards Institute, Wayne, USA.

17. M44a2, Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline-second Edition 2009, clinical and laboratory standards Institute, Wayne, USA.
18. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2008. EUCAST definitive document Edef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents.
19. Manuel cuenca-Estrella, Wendy lee-yang, Meral A. Ciblak, Beth A. Arthington-Skaggs Emilia Mellado, David W. Warnock, and Juan I. Rodriguez-tudela. Comparative Evaluation of NCCLS M27-a and EUCAST Broth Microdilution Procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46 (11): 3644-3647.
20. A. Espinel-Ingroff, F. Barchiesi, M. cuenca-Estrella, M. A. Pfaller, M. Rinaldi, J. I. Rodriguez-Tudela, and P. E. Verweij. International and Multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 Broth Microdilution Methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole. J Clin Microbiol. 2005;43 (8): 3884-3889.
21. Maiken Cavling Arendrup, Guillermo Garcia-Effron, Cornelia Lass-Flörl, Alicia Gomez Lopez, Juan-Luis Rodriguez-Tudela, Manuel Cuenca-Estrella, and David S. Perlin. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species: comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, disk diffusion, and agar dilution Methods with RPMI and Isosensitest Media. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54 (1): 426-439.

22. M. A. Pfaller, M. Castanheira, D. J. Diekema, S. A. Messer, G. J. Moet, and R. N. Jones. Comparison of European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) and E-test Methods with the CLSI Broth Microdilution Method for Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. *J clin Microbiol.* 2010;48 (5): 1592-1599.
23. M. a. Pfaller, I. Boyken, R. J. Hollis, J. Kroeger, S. A. Messer, S. Tendolkar, and D. J. Diekema. *In vitro* susceptibility of Invasive Isolates of *Candida* spp. to Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin: six years of global surveillance. *J Clin Microbiol.* 2008;46 (1): 150-156
24. De Rosa FG, Garazzino S, Pasero D, Di Perri G, Ranieri VM. Invasive candidiasis and candidemia: new guidelines. *Minerva Anesthesiol.* 2009;75(7-8):453-8.
25. Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ *et al.*; Infectious Diseases Society of America. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis.* 2004;38:161-89.
26. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK JR, Calandra TF, Edwards JE JR, filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner I, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD; Infectious diseases society of America. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;48:503-535.
27. Glöckner A. Treatment and prophylaxis of invasive candidiasis with anidulafungin, caspofungin and micafungin:review of the literature. *Eur J Med Res.* 2011;16(4):167-79.

28. Infectious diseases working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO), Bohme A, Ruhnke M, Buchheidt D, Cornely OA, Einsele H, Enzensberger R, Hebart H, Heinz W, Junghanss C, Karthaus M, Kruger W, Krug U, Kubin T, Penack O, Reichert D, Reuter S, Silling G, Sudhoff T, Ullmann AJ, Maschmeyer G. Treatment of invasive fungal infections in cancer patients--recommendations of the Infectious diseases working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Hematol.* 2009;88:97-110.
29. Diekema, D. J., and M. A. Pfaller. Nosocomial candidemia: an ounce of prevention is better than a pound of cure. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2004;25:624-626.
30. O'Grady, N. P., M. Alexander, E. P. Dellinger, J. L. Gerberding, S. O. Heard, D. G. Maki, H. Masur, R. P. McCormick, L. A. Mermal, M. L. Pearson, I. I. Raad, A. Randolph, and R. A. Weinstein. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2002;51:1-29.
31. Lin, M. Y., Y. Carmeli, J. Zumsteg, E. L. Flores, J. Tolentino, P. Sreeramoju, and S. G. Weber. Prior antimicrobial therapy and risk for hospital-acquired *Candida glabrata* and *Candida krusei* fungemia: a case-case-control study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49:4555-4560.
32. Marr, K. A., K. Seidel, T. C. White, and R. A. Bowden. Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. *J. Infect. Dis.* 2000;181:309-316.

33. Prentice, H. G., C. C. Kibbler, and A. G. Prentice. Towards a targeted, risk-based, antifungal strategy in neutropenic patients. *Br. J. Haematol.* 2000;110:273–284.
34. Rex, J. H. Antifungal prophylaxis in the intensive care unit: who should get it? *Crit. Care Med.* 2006;34:1286–1287.
35. Almirante, B., D. Rodriguez, M. Cuenca-Estrella, M. Almela, F. Sanchez, J. Ayats, C. Alonso-Tarres, J. L. Rodriguez-Tudela, and A. Pahissa. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44:1681-1685.
36. Colombo, A. L., M. Nucci, B. J. Park, S. A. Nouer, B. Arthington-Skaggs, D. A. da Matta, D. Warnock, and J. Morgan. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44:2816–2823.
37. Fridkin, S. K., D. Kaufman, J. R. Edwards, S. Shetty, and T. Horan. Changing incidence of *Candida* bloodstream infections among NICU patients in the United States: 1995–2004. *Pediatrics* 2006;117:1680–1687.
38. Nakamura, T., and H. Takahashi. Epidemiological study of *Candida* infections in blood: susceptibilities of *Candida* spp. to antifungal agents, and clinical features associated with the candidemia. *J. Infect. Chemother.* 2006;12: 132–138.
39. Medrano, D. J., R. S. Brilhante, A. Cordeiro Rde, M. F. Rocha, S. H. Rabenhorst, and J. J. Sidrim. Candidemia in a Brazilian hospital: the

- importance of *Candida parapsilosis*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 2006; 48:17–20.
40. Ashford, B. Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1928;8:507–538.
41. Joachim, H., and S. Polayes. Subacute endocarditis and systemic mycosis (monilia). JAMA 1940;205–208.
42. Tavanti, A., A. D. Davidson, N. A. Gow, M. C. Maiden, and F. C. Odds. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J. Clin. Microbiol. 2005;43:284–292.
43. Laffey, S. F., and G. Butler. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. Microbiology 2005;151:1073–1081.
44. Kim, S. K., K. El Bissati, and C. Ben Mamoun. Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*. Microbiology 2006;152:2885–2894.
45. Clark, T. A., S. A. Slavinski, J. Morgan, T. Lott, B. A. Arthington-Skaggs, M. E. Brandt, R. M. Webb, M. Currier, R. H. Flowers, S. K. Fridkin, and R. A. Hajjeh. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. J. Clin. Microbiol. 2004;42:4468–4472.
46. Clerihew, L., T. L. Lamagni, P. Brocklehurst, and W. McGuire. *Candida parapsilosis* infection in very low birthweight infants. Arch. Dis. Child Fetal Neonatal ed. 2007;92:F127–F129.

47. Weems, J. J., Jr. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. Clin. Infect. Dis. 1992;14:756–766.
48. Messer, S. A., R. N. Jones, and T. R. Fritsche. International surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). J. Clin. Microbiol. 2006;44:1782–1787.
49. Pfaller, M. A., D. J. Diekema, D. L. Gibbs, V. A. Newell, J. F. Meis, I. M. Gould, W. Fu, A. L. Colombo, and E. Rodriguez-Noriega. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. J. Clin. Microbiol. 2007;45:1735–1745.
50. Kojic, E. M., and R. O. Darouiche. Comparison of adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to silicone catheters *in vitro* and *in vivo*. Clin. Microbiol. Infect. 2003;9:684–690.
51. Martino, P., C. Girmenia, A. Micozzi, R. Raccah, G. Gentile, M. Venditti, and F. Mandelli. Fungemia in patients with leukemia. Am. J. Med. Sci. 1993;306:225–232.
52. Torres, H. A., D. P. Kontoyiannis, and K. V. Rolston. High-dose fluconazole therapy for cancer patients with solid tumors and candidemia: an observational, noncomparative retrospective study. Support Care Cancer 2004;12:511–516.
53. Wingard, J. R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. Clin. Infect. Dis. 1995;20:115–125.

54. Patel, R., K. L. Grogg, W. D. Edwards, A. J. Wright, and N. M. Schwenk. Death from inappropriate therapy for Lyme disease. *Clin. Infect. Dis.* 2000;31:1107–1109.
55. Brito, L. R., T. Guimaraes, M. Nucci, R. C. Rosas, L. Paula Almeida, D. A. Da Matta, and A. L. Colombo. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. *Med. Mycol.* 2006;44:261–266.
56. Weems, J. J., Jr., M. E. Chamberland, J. Ward, M. Willy, A. A. Padhye, and S. L. Solomon. *Candida parapsilosis* fungemia associated with parenteral nutrition and contaminated blood pressure transducers. *J. Clin. Microbiol.* 1987;25:1029–1032.
57. Saxen, H., M. Virtanen, P. Carlson, K. Hoppu, M. Pohjavuori, M. Vaara, J. Vuopio-Varkila, and H. Peltola. Neonatal *Candida parapsilosis* outbreak with a high case fatality rate. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1995;14:776–781.
58. Kuhn, D. M., P. K. Mikherjee, T. A. Clark, C. Pujol, J. Chandra, R. A. Hajjeh, D. W. Warnock, D. R. Soil, and M. A. Ghannoum. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerg. Infect. Dis.* 2004;10:1074–1081.
59. Benjamin, D. K., Jr., K. Ross, R. E. McKinney, Jr., D. K. Benjamin, R. Auten, and R. G. Fisher. When to suspect fungal infection in neonates: a clinical comparison of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* fungemia with coagulase-negative staphylococcal bacteremia. *Pediatrics* 2000;106:712–718.
60. Saiman, L., E. Ludington, J. D. Dawson, J. E. Patterson, S. Rangel-Frausto, R. T. Wiblin, H. M. Blumberg, M. Pfaller, M. Rinaldi, J. E. Edwards, R. P. Wenzel,

- and W. Jarvis. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2001;20:1119–1124.
61. Contreras, I., J. Ponton, and G. Quindos. Prevalence of *Candida parapsilosis* in the oral cavities of infants in Spain. *Clin. Infect. Dis.* 1994;18:480–481.
62. Waggoner-Fountain, L. A., M. W. Walker, R. J. Hollis, M. A. Pfaller, J. E. Ferguson II, R. P. Wenzel, and L. G. Donowitz. Vertical and horizontal transmission of unique *Candida* species to premature newborns. *Clin. Infect. Dis.* 1996;22:803–808.
63. van Asbeck, E. C., Y. C. Huang, A. N. Markham, K. V. Clemons, and D. A. Stevens. *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. *Mycopathologia* 2007;164:287–293.
64. Clark, T. A., S. A. Slavinski, J. Morgan, T. Lott, B. A. Arthington-Skaggs, M. E. Brandt, R. M. Webb, M. Currier, R. H. Flowers, S. K. Fridkin, and R. A. Hajjeh. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:4468–4472.
65. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:606-25.
66. Girmenia, C., P. Martino, F. De Bernardis, G. Gentile, M. Boccanera, M. Monaco, G. Antonucci, and A. Cassone. Rising incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patients with hematologic malignancies: clinical aspects, predisposing factors, and differential pathogenicity of the causative strains. *Clin. Infect. Dis.* 1996;23:506–514.

67. Kossoff, E. H., E. S. Buescher, and M. G. Karlowicz. Candidemia in a neonatal intensive care unit: trends during fifteen years and clinical features of 111 cases. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1998;17:504–508.
68. Gudlaugsson, O., S. Gillespie, K. Lee, J. Vande Berg, J. Hu, S. Messer, L. Herwaldt, M. Pfaller, and D. Diekema. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin. Infect. Dis.* 2003;37:1172–1177.
69. Alonso-Valle, H., O. Acha, J. D. Garcia-Palomo, C. Farinas-Alvarez, C. Fernandez-Mazarrasa, and M. C. Farinas. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2003;22:254–257.
70. Levy, I., L. G. Rubin, S. Vasishtha, V. Tucci, and S. K. Sood. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. *Clin. Infect. Dis.* 1998;26:1086–1088.
71. Mujica, M. T., J. L. Finkelievich, V. Jewtuchowicz, and C. A. Iovannitti. Prevalence of *Candida albicans* and *Candida non-albicans* in clinical samples during 1999–2001. *Rev. Argent Microbiol.* 2004;36:107–112.
72. Ng, K. P., T. L. Saw, S. L. Na, and T. S. Soo-Hoo. Systemic *Candida* infection in University hospital 1997–1999: the distribution of *Candida* biotypes and antifungal susceptibility patterns. *Mycopathologia* 2001;149:141-146.
73. Welbel, S. F., M. M. McNeil, R. J. Kuykendall, T. J. Lott, A. Pramanik, R. Silberman, A. D. Oberle, L. A. Bland, S. Agüero, M. Arduino, S. Crow, and W. R. Jarvis. *Candida parapsilosis* bloodstream infections in neonatal intensive care unit patients: epidemiologic and laboratory confirmation of a common source outbreak. *Pediatric Infect. Dis. J.* 1996;15:998–1002.

74. Plouffe, J. F., D. G. Brown, J. Silva, Jr., T. Eck, R. L. Stricof, and F. R. Fekety, Jr. Nosocomial outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia related to intravenous infusions. *Arch. Intern. Med.* 1977;137:1686–1689.
75. San Miguel, L. G., J. Cobo, E. Otheo, A. Sanchez-Sousa, V. Abreira, and S. Moreno. Secular trends of candidemia in a large tertiary-care hospital from 1988 to 2000: emergence of *Candida parapsilosis*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2005;26:548–552.
76. Garzoni, C., V. A. Nobre, and J. Garbino. *Candida parapsilosis* endocarditis: a comparative review of the literature. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2007;26:915–926.
77. Dorko, E., E. Pilipcinec, and L. Tkacikova. *Candida* species isolated from cerebrospinal fluid. *Folia Microbiol. (Praha)* 2002;47:179–181.
78. Wang, A. Y., A. W. Yu, P. K. Li, P. K. Lam, C. B. Leung, K. N. Lai, and S. F. Lui. Factors predicting outcome of fungal peritonitis in peritoneal dialysis: analysis of a 9-year experience of fungal peritonitis in a single center. *Am. J. Kidney Dis.* 2000;36:1183–1192.
79. Chen, K. H., C. T. Chang, C. C. Yu, J. Y. Huang, C. W. Yang, and C. C. Hung. *Candida parapsilosis* peritonitis has more complications than other *Candida* peritonitis in peritoneal dialysis patients. *Renal Fail.* 2006;28:241–246.
80. Legout, L., M. Assal, P. Rohner, D. Lew, L. Bernard, and P. Hoffmeyer. Successful treatment of *Candida parapsilosis* (fluconazole-resistant) osteomyelitis with caspofungin in a HIV patient. *Scand. J. Infect. Dis.* 2006;38:728–730.

81. Stern, W. H., E. Tamura, R. A. Jacobs, V. G. Pons, R. D. Stone, D. M. O'Day, and A. R. Irvine. Epidemic postsurgical *Candida parapsilosis* endophthalmitis. Clinical findings and management of 15 consecutive cases. *Ophthalmology* 1985;92:1701–1709.
82. Feman, S. S., J. C. Nichols, S. M. Chung, and T. A. Theobald. Endophthalmitis in patients with disseminated fungal disease. *Trans. Am. Ophthalmol Soc.* 2002;100:67–71.
83. Vennewald, I., J. Schonlebe, and E. Klemm. Mycological and histological investigations in humans with middle ear infections. *Mycoses* 2003;46:12–18.
84. Gautret, P., M. H. Rodier, C. Kauffmann-Lacroix, and J. L. Jacquemin. Onychomycosis due to *Candida parapsilosis*. *Mycoses* 2000;43:433–435.
85. da Silva, E. H., S. Ruiz Lda, F. E. Matsumoto, M. E. Auler, M. C. Giudice, D. Moreira, W. Szeszs, and C. R. Paula. Candiduria in a public hospital of Sao Paulo (1999–2004): characteristics of the yeast isolates. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 2007;49:349–353.
86. Branchini, M. L., M. A. Pfaller, J. Rhine-Chalberg, T. Frempong, and H. D. Isenberg. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J. Clin. Microbiol.* 1994;32:452–456.
87. Panagoda, G. J., A. N. Ellepola, and L. P. Samaranayake. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses* 2001;44:29–35.
88. Kuhn, D. M., T. George, J. Chandra, P. K. Mukherjee, and M. A. Ghannoum. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin

- B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002;46:1773–1780.
89. Kuhn, D. M., J. Chandra, P. K. Mukherjee, and M. A. Ghannoum. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect. Immun.* 2002;70:878–888.
90. Laffey, S. F., and G. Butler. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology* 2005;151:1073–1081.
91. Ramage, G., J. P. Martinez, and J. L. Lopez-Ribot. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* 2006;6:979–986.
92. Tumbarello, M., B. Posteraro, E. M. Trecarichi, B. Fiori, M. Rossi, R. Porta, K. de Gaetano Donati, M. La Sorda, T. Spanu, G. Fadda, R. Cauda, and M. Sanguinetti. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45:1843–1850.
93. Shin, J. H., S. J. Kee, M. G. Shin, S. H. Kim, D. H. Shin, S. K. Lee, S. P. Suh, and D. W. Ryang. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:1244–1248.
94. Ruchel, R., B. Boning, and M. Borg. Characterization of a secretory proteinase of *Candida parapsilosis* and evidence for the absence of the enzyme during infection in vitro. *Infect. Immun.* 1986;53:411–419.
95. Ruchel, R., F. de Bernardis, T. L. Ray, P. A. Sullivan, and G. T. Cole. *Candida* acid proteinases. *J. Med. Vet. Mycol.* 1992;30:123–132.

96. Dagdeviren, M., N. Cerikcioglu, and M. Karavus. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients. *Mycoses* 2005;48:321–326.
97. Schaller, M., N. Krnjaic, M. Niewerth, G. Hamm, B. Hube, and H. C. Korting. Effect of antimycotic agents on the activity of aspartyl proteinases secreted by *Candida albicans*. *J. Med. Microbiol.* 2003;52:247–249.
98. Ghannoum, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000;13:122–143.
99. Schaller, M., C. Borelli, H. C. Korting, and B. Hube. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 2005;48:365–377.
100. Gacser, A., W. Schafer, J. S. Nosanchuk, S. Salomon, and J. D. Nosanchuk. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet. Biol.* 2007;44:1336–1341.
101. Moudgal, V., T. Little, D. Boikov, and J. A. Vazquez. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49:767–769.
102. Linder, N., G. Klinger, I. Shalit, I. Levy, S. Ashkenazi, G. Haski, O. Levit, and L. Sirota. Treatment of candidaemia in premature infants: comparison of three amphotericin B preparations. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003;52:663–667.

103. Ostrosky-Zeichner, L., J. H. Rex, P. G. Pappas, R. J. Hamill, R. A. Larsen, H. W. Horowitz, W. G. Powderly, N. Hyslop, C. A. Kauffman, J. Cleary, J. E. Mangino, and J. Lee. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003;47:3149–3154.
104. Ellis, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002;49:7–10.
105. Kaufman, D. A. Fluconazole prophylaxis: can we eliminate invasive *Candida* infections in the neonatal ICU? *Curr. Opin. Pediatr.* 2008;20:332–340.
106. Smego, R. A., Jr., J. R. Perfect, and D. T. Durack. Combined therapy with amphotericin B and 5-fluorocytosine for *Candida* meningitis. *Rev. Infect. Dis.* 1984;6:791–801.
107. Barchiesi, F., E. Spreghini, S. Tomassetti, A. Della Vittoria, D. Arzeni, E. Manso, and G. Scalise. Effects of caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006;50:2719–2727.
108. Cheung, C., Y. Guo, P. Gialanella, and M. Feldmesser. Development of candidemia on caspofungin therapy: a case report. *Infection* 2006;34:345–348.
109. Brielmaier, B. D., E. Casabar, C. M. Kurtzborn, P. S. McKinnon, and D. J. Ritchie. Early clinical experience with anidulafungin at a large tertiary care medical center. *Pharmacotherapy* 2008;28:64–73.

110. Chamilos, G., R. E. Lewis, N. Albert, and D. P. Kontoyiannis. Paradoxical effect of echinocandins across *Candida* species in vitro: evidence for echinocandin-specific and *Candida* species-related differences. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007;51:2257–2259.
111. Forrest, G. N., E. Weekes, and J. K. Johnson. Increasing incidence of *Candida parapsilosis* candidemia with caspofungin usage. *J. Infect.* 2008; 56:126–129.
112. Perlin DS. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat.* 2007;10(3):121-30.
113. Denning, D.W., Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 2003; 362:1142–1151.
114. Kartsonis, N.A., Nielsen, J., Douglas, C.M. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. *Drug Resist. Updat.* 2003;6:197–218.
115. Douglas, C.M. Understanding the microbiology of the *Aspergillus* cell wall and the efficacy of caspofungin. *Med. Mycol.* 2006;44:95–99.
116. Wagner, C., Graninger, W., Presterl, E., Joukhadar, C. The echinocandins: comparison of their pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical applications. *Pharmacology* 2006;78:161–177.
117. Bennett, J.E. Echinocandins for candidemia in adults without neutropenia. *N. Engl. J. Med.* 2006;355:1154–1159.
118. Pfaller, M.A., Boyken, L., Hollis, R.J., Messer, S.A., Tendolkar, S., et al. *In vitro* activities of anidulafungin against more than 2500 clinical isolates of *Candida* spp., including 315 isolates resistant to fluconazole. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43:5425–5427.

119. Pfaller, M.A., Messer, S.A., Boyken, L., Rice, C., Tendolkar, S., et al. Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41:5729–5731.
120. Kartsonis, N., Killar, J., Mixson, L., Hoe, C.M., Sable, C., et al. Caspofungin susceptibility testing of isolates from patients with esophageal candidiasis or invasive candidiasis: relationship of MIC to treatment outcome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49:3616–3623.
121. Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Boyken, L., Messer, S.A., Tendolkar, S., et al. Effectiveness of anidulafungin in eradicating *Candida* species in invasive candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49:4795–4797.
122. Schimoler-O'Rourke, R., Renault, S., Mo, W., Selitrennikoff, C.P. *Neurospora crassa* FKS protein binds to the (1,3)beta-glucan synthase substrate, UDP-glucose. *Curr. Microbiol.* 2003;46:408–412.
123. Mazur, P., Baginsky, W. *In vitro* activity of 1,3-beta-d-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *J. Biol. Chem.* 1996;271:14604–14609.
124. Brown, G.D., Gordon, S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity* 2003;19:311–315.
125. Utsugi, T., Minemura, M., Hirata, A., Abe, M., Watanabe, D., et al. Movement of yeast 1,3-beta-glucan synthase is essential for uniform cell wall synthesis. *Genes Cells* 2002;7:1–9.
126. Reinoso-Martin, C., Schuller, C., Schuetzer-Muehlbauer, M., Kuchler, K. The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the

- antifungal drug caspofungin through activation of Slt2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryot. Cell* 2003;2:1200–1210.
127. Fidan I, Yesilyurt E, Kalkanci A, Aslan SO, Sahin N, Ogan MC, Dizbay M. Immunomodulatory effects of voriconazole and caspofungin on human peripheral blood mononuclear cells stimulated by *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Am J Med Sci.* 2014;348(3):219-23.
128. Wheeler RT, Fink GR. A drug-sensitive genetic network masks fungi from the immune system. *PLoS Pathog.* 2006;2(4):e35.
129. Walker LA, Gow NA, Munro CA. Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol.* 2010;47:117-26.
130. Wheeler, R.T., Kombe, D., Agarwala, S.D., Fink, G.R. Dynamic, morphotypespecific *Candida albicans* beta-glucan exposure during infection and drug treatment. *PLoS Pathog.* 2008;4: e1000227.
131. Tuite A, Mullick A, Gros P. Genetic analysis of innate immunity in resistance to *Candida albicans*. *Genes Immun* 2004;5: 576–587.
132. Casadevall A1, Pirofski LA. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2003;1:17-24.
133. Andes D, Diekema DJ, Pfaller MA, Bohrmuller J, Marchillo K, Lepak A. In vivo comparison of the pharmacodynamic targets for echinocandin drugs against *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54 (6):2497-506.
134. Medzhitov R, Schneider DS, and Soares MP. Disease tolerance as a defense strategy. *Science* 2012; 335: 936–941.

135. Romani L, and Puccetti P. Controlling pathogenic inflammation to fungi. *ExpertRev.Anti.Infect.Ther.* 2007; 5: 1007–1017.
136. Kurtz, M.B., Abruzzo, G., Flattery, A., Bartizal, K., Marrinan, J.A., et al. Characterization of echinocandin-resistant mutants of *Candida albicans*: genetic, biochemical, and virulence studies. *Infect. Immun.* 1996;64:3244–3251.
137. Park, S., Kelly, R., Kahn, J.N., Robles, J., Hsu, M.J., et al. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49:3264–3273.
138. Lee KK, Maccallum DM, Jacobsen MD, Walker LA, Odds FC, Gow NA, Munro CA. Elevated cell wall chitin in *Candida albicans* confers echinocandin resistance in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:208-17
139. Walker LA, Gow NA, Munro CA. Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:146-54.
140. Stevens, D.A., Espiritu, M., Parmar, R. Paradoxical effect of caspofungin: reduced activity against *Candida albicans* at high drug concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48:3407–3411.
141. Stevens, D.A., White, T.C., Perlin, D.S., Selitrennikoff, C.P. Studies of the paradoxical effect of caspofungin at high drug concentrations. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2005;51:173–178.
142. Stevens, D.A., Ichinomiya, M., Koshi, Y., Horiuchi, H. Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC

- (paradoxical effect) accomplished by increased cellwall chitin; evidence for beta-1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006;50:3160–3161.
143. van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit. Rev. Microbiol.* 2009;35: 283-309.
144. Wenzel RP, Gennings C. Bloodstream infections due to *Candida* species in the intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. *Clin. Infect. Dis.* 2005;41: S389-93.
145. Sarvikivi E, Lyytikäinen O, Soll DR, Pujol C, Pfaller MA, Richardson M, Koukila-Kähkölä P, Luukkainen P, Saxén H. Emergence of fluconazole resistance in a *Candida parapsilosis* strain that caused infections in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43: 2729-35.
146. Lupetti A, Tavanti A, Davini P, Ghelardi E, Corsini V, Merusi I, Boldrini A, Campa M, Senesi S. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40: 2363-9.
147. Arendrup M, Horn T, Frimodt-Møller N. In vivo pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. *Infection* 2002;30: 286-91.
148. Wiederhold NP, Lewis RE. The echinocandin antifungals: an overview of the pharmacology, spectrum and clinical efficacy. *Expert Opin. Investig. Drugs* 2003;12: 1313-33.

149. Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J, del Castillo L. In vitro fungicidal activities of echinocandins against *Candida metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. parapsilosis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54: 2194-7.
150. Channoum MA, Chen A, Buhari M, Chadra J, Mukherjee PK, Baxa D, Golembieski A, Vazquez JA. Differential in vitro activity of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against *Candida parapsilosis* isolates recovered from a burn unit. *Clin. Microbiol. Infect.* 2009;15: 274-279.
151. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J. Clin. Microbiol.* 2008;46: 150-6.
152. Sun HY, Singh N. Characterisation of breakthrough invasive mycoses in echinocandin recipients: an evidence-based review. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2010;35: 211-8.
153. Sipsas NV, Lewis RE, Tarrand J, Hachem R, Rolston KV, Raad II, Kontoyiannis DP. Candidemia in patients with hematologic malignancies in the era of new antifungal agents (2001-2007): stable incidence but changing epidemiology of a still frequently lethal infection. *Cancer* 2009;115: 4745-52.
154. Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, Arendrup MC, Brown SD, Lockhart SR, Motyl M, Perlin DS; CLSI Subcommittee for Antifungal Testing. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of

- molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. *Drug Resist. Updat.* 2011;14: 164-76.
155. Salas V, Pastor FJ, Calvo E, Mayayo E, Quindós G, Carrillo AJ, Guarro J. Anidulafungin in treatment of experimental invasive infection by *Candida parapsilosis*: in vitro activity, (1→3)-beta-D-glucan and mannan serum levels, histopathological findings, and in vivo efficacy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011;55: 4985-9.
156. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts-Third edition: Approved standard M27-A3. CLSI, Wayne, Pa, USA.
157. Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *Clin Microbiol.* 2012;50: 2846-56.
158. Wiederhold NP, Najvar LK, Bocanegra RA, Kirkpatrick WR, Patterson TF. Caspofungin dose escalation for invasive candidiasis due to resistant *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011;55: 3254-60.
159. Spellberg B, Ibrahim AS, Edwards JE Jr, Filler SG. Mice with disseminated candidiasis die of progressive sepsis. *J. Infect. Dis.* 2005;192: 336-43.
160. Trammell RA, Toth LA. Markers for predicting death as an outcome for mice used in infectious disease research. *Comp. Med.* 2011;61: 492-8.
161. Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Giannini D, Scalise G. Caspofungin in combination with amphotericin B against *Candida parapsilosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007;51: 941-5.

162. Földi R, Kovács R, Gesztelyi R, Kardos G, Berényi R, Juhász B, Szilágyi J, Mózes J, Majoros L. Comparison of in vitro and vivo efficacy of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*. *Mycopathologia* 2012;174: 311-8.
163. Szilágyi J, Földi R, Gesztelyi R, Bayegan S, Kardos G, Juhász B, Majoros L. Comparison of the kidney fungal burden in experimental disseminated candidiasis by species of the *Candida parapsilosis* complex treated with fluconazole, amphotericin B and caspofungin in a temporarily neutropenic murine model. *Chemotherapy* 2012;58: 159-64.
164. Levin AS, Costa SF, Mussi NS, Basso M, Sinto SI, Machado C, Geiger DC, Villares MC, Schreiber AZ, Barone AA, Branchini ML. *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998;30(4):243-9.
165. Bonassoli LA, Bertoli M, Svidzinski TI. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J Hosp Infect.* 2005;59(2):159-62.
166. Garcia-Effron G, Katiyar SK, Park S, Edlind TD, Perlin DS. A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008;52: 2305-12.
167. van Asbeck E, Clemons KV, Martinez M, Tong AJ, Stevens DA. Significant differences in drug susceptibility among species in the *Candida parapsilosis* group. *Diagn. Microbiol. Infect Dis.* 2008;62: 106-9.

168. Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Inhibition of *Candida parapsilosis* mitochondrial respiratory pathways enhances susceptibility to caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006;50: 744-7.
169. van Asbeck EC, Hoepelman AI, Scharringa J, Verhoef J. The echinocandin caspofungin impairs the innate immune mechanism against *Candida parapsilosis*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2009;33: 21-6.
170. Stevens DA, Espiritu M, Parmar R. Paradoxical effect of caspofungin: reduced activity against *Candida albicans* at high drug concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48: 3407-11.
171. Torres-Rodriguez JM, Carrillo-Muñoz A, Gallach-Bau C, Madrenys N. Susceptibility of *Candida* species to cilofungin (LY-121019). *Mycoses* 1989;32: 316-8.
172. Clemons KV, Espiritu M, Parmar R, Stevens DA. Assessment of the paradoxical effect of caspofungin in therapy of candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006;50: 1293-7.
173. Fleischhacker M, Radecke C, Schulz B, Ruhnke M. Paradoxical growth effects of the echinocandins caspofungin and micafungin, but not of anidulafungin, on clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008;27: 127-31.
174. Kristian SA, Timmer AM, Liu GY, Lauth X, Sal-Man N, Rosenfeld Y, Shai Y, Gallo RL, Nizet V. Impairment of innate immune killing mechanisms by bacteriostatic antibiotics. *FASEB J.* 2007;21(4):1107-16.
175. Romani L, Fallarino F, De Luca A, Montagnoli C, D'Angelo C, Zelante T, Vacca C, Bistoni F, Fioretti MC, Grohmann U, Segal BH, and Puccetti P.

Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease. *Nature* 2008; 451: 211–215.

176. Ben-Ami R, Garcia-Effron G, Lewis RE, Gamarra S, Leventakos K, Perlin DS, Kontoyiannis DP. Fitness and virulence costs of *Candida albicans* FKS1 hot spot mutations associated with echinocandin resistance. *J. Infect. Dis.* 2011;204:626-35.
177. Ben-Ami R, Kontoyiannis DP. Resistance to echinocandins comes at a cost: the impact of FKS1 hotspot mutations on *Candida albicans* fitness and virulence. *Virulence* 2012;3: 95-7.
178. Ben-Ami R, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Immunocompromised hosts: immunopharmacology of modern antifungals. *Clin. Infect. Dis.* 2008;47: 226-35.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

