

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Opportunista patogén
élesztőgombák fenotípusos és
genetikai diverzitásának vizsgálata**

Kreith-Boros Enikő

Témavezető: Prof. Dr. Pócsi István



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2018

1. Bevezetés

A *Candida albicans* a legtöbbet tanulmányozott opportunista humán patogén élesztőgomba. Az ember normál mikrobiotájának tagjaként jelen van az egészséges szervezetben is, a szájüregben, az emésztőrendszerben és a női nemi szervek nyálkahártyáján. Az immunrendszer legyengülésével pedig komolyabb, szerveket vagy az egész szervezetet (candidiázis) és vérkeringést érintő (candidémia) fertőzés alakulhat ki (Brown és mtsai. 2012). Az invazív gombás fertőzéseket 80-90%-ban a *Candida* fajok okozzák, ezen belül is a leggyakrabban izolált faj a klinikumban (több mint 50%-ban) a *C. albicans* gomba (Sardi és mtsai. 2013).

A *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgomba az ember által a sörgyárásban, borászatban és pékiparban a legrégebb óta alkalmazott mikroba (McGovern és mtsai. 2004, Yáñez és mtsai. 2009), amelynek ételismiszerként vagy napjainkban probiotikumként (*S. cerevisiae* 'var. *boulardii*') való fogyasztása jótékony hatással is járhat (Moyad 2007; Ghannoum és mtsai. 2010) ugyanakkor előfordultak már olyan esetek is, ahol gombás fertőzések okozójaként izoláltak *S. cerevisiae*-t (Smith és mtsai. 2002, Enache-Angoulvant 2005).

A *C. albicans* világszerte elterjedt, így egyes földrajzi területeken felmérhető diverzitásával több tanulmány is foglalkozott. A klinikai *C. albicans* izolátumok globális szintű vizsgálatáról elsősorban Odds és munkatársai (2006, 2007) számoltak be, akik ezen gombák populációinak nagy változatosságát igazolták.

Az általánosan biztonságosnak tartott *S. cerevisiae* élesztőgombáról napjainkban sem nyilvánvaló, hogy az emberi szervezetben való kolonizációja átmeneti vagy állandó jellegű, és az általa okozott mikózisokat mi váltja ki pontosan (Goldstein és McCusker 2001; Strobe és mtsai. 2015). A *S. cerevisiae* esetleges opportunistá patogénné válásáért felelőssé tehető fenotípusos és

genotípusos tulajdonságokat Anoop és munkatársai (2015) tanulmányozták, akik azt tapasztalták, hogy az említett tulajdonságok gyakran nagyon hasonlóak a nem-klinikai és klinikai *S. cerevisiae* izolátumokat tekintve.

A patogén gombák bizonyos tulajdonságait, amelyek a gombát a fertőzés folyamatában segítik, virulenciafaktoroknak nevezzük (pl. Hube 2004; Mayer és mtsai. 2013). A legfontosabb virulencia faktorok közé tartozik: a gomba (élesztő↔hifa) dimorf átalakulásra való képessége, a gombasejtek adhéziós képessége és biofilm képzése, hidrolitikus enzimek, mint az aszpartát proteázok és a foszfolipázok termelése és a magas hőmérsékleten való szaporodási képességük is (Hube 2004; Höfs és mtsai. 2016), melyeket tanulmányozva és összehasonlítva mélyebb betekintést kaphatunk a különböző tulajdonságú gombák előfordulásáról és a gombák esetleges tulajdonságaik szerinti csoportosulásáról.

2. Célkitűzések

Célunk az volt, hogy egy szűk földrajzi területen belül vizsgáljuk meg a klinikai *C. albicans* és *S. cerevisiae* izolátumok fenotípusos tulajdonságait, illetve a *C. albicans* izolátumok ABC genotípusait, képet kapva arról, hogy egy jól behatárolható területen, egy klinikán, mennyire sokfélék az említett élesztők. Célul tűztük ki annak felmérését, hogy milyen geno- és fenotípusos tulajdonságokkal jellemezhetők az egyes, eltérő betegekben és eltérő anatómiai helyeken izolálható élesztők. Az izolátumokat vizsgálatainkban ún. metapopulációként értelmeztük, amelyek kellő számban jelen vannak az egyes anatómiai helyeken ahhoz, hogy adott időpontban izolálni lehessen azokat. Számunkra a mintavételek időpontja (év, hónap: betegtől független paraméterek) abból a szempontból volt fontos, hogy megtudjuk: adott időpontban izolálásra került *C. albicans* izolátum fenotípusos tulajdonságai, ABC genotípusai és betegtől függő paraméterei (testrész vagy testtáj, a beteg kora, neme, alapbetegségének súlyossága, a kórházi osztály ahol a mintavétel történt) között van-e szignifikáns összefüggés. Feltételezésünk szerint, ha az év bizonyos időszakában más-más tulajdonságokkal jellemezhető gombák kerülnek izolálásra, az azt jelzi, hogy az adott klinikán felbukkanó élesztők dinamikusan változnak.

Tanulmányunkban a klinikai *C. albicans* és *S. cerevisiae* izolátumok fenotípusos tulajdonságainak vizsgálataiból indultunk ki. Célunk az volt, hogy a fenotípusos tulajdonságok, virulencia faktorok vizsgálatainak eredményeit összevetve megtudjuk, hogy az izolátumok fenotípusos tulajdonságaik szerint csoportosulnak-e, és ha igen hogyan. Valamint terveztük annak felmérését, hogy egy adott időpontban izolálásra került *C. albicans* izolátum fenotípusos tulajdonságai, ABC genotípusai és betegtől függő tulajdonságai (testrész vagy testtáj, a beteg kora, neme, alapbetegségének

súlyossága, a kórházi osztály ahol a mintavétel történt) között van-e szignifikáns összefüggés.

A következő vizsgálatok elvégzését terveztük: a *C. albicans* gomba hifázó képességének felmérését, mindkét fajnál a gomba inert felszínhez történő adhéziós képességének, a hidrolitikus enzimaktivitásaiknak, hemolitikus aktivitásaiknak mérését, magas hőmérsékleten való szaporodásuknak tesztelését, antifungális szerekkel és egy oxidatív stresszt okozó szerrel szembeni érzékenységeinek meghatározását. A *C. albicans* izolátumoknak a felsoroltakon kívül további paraméterként az ABC genotípusaik meghatározása szerepelt terveink között.

A következő kérdésekre kerestük a választ:

- 1.) Adott időpontban (évben, hónapban) izolált és bizonyos fenotípusos tulajdonságokkal rendelkező *C. albicans* gomba előfordulása mutat-e valamiféle anatómiai preferenciát (adott testrészt, vagy testtáját kolonizál-e inkább), illetve észrevehető-e csoportosulásuk a beteg-függő tulajdonságok szerint (beteg kora, neme, alapbetegsége, kórházi osztály ahol az izolálás megtörtént)?
- 2.) A gomba korábbiakban felsorolt, vizsgált fenotípusos tulajdonságai, virulencia faktorai között, illetve a fenotípusos tulajdonságok és a genotípusos jellemző között (ABC genotípus) van-e összefüggés?
- 3.) Az ABC genotípusok csoportosulnak-e az izolálás ún. beteghez kapcsolt (az anatómiai forrás: testtáj vagy testrész, a beteg kora, neme, alapbetegsége, kórházi osztály ahol az izolálás történt) vagy betegtől független (az izolálás éve, hava) paraméterei szerint?
- 4.) Az *S. cerevisiae* klinikai izolátumok általunk vizsgált fenotípusos tulajdonságai között van-e összefüggés, illetve az izolátumok csoportokba szerveződnek-e az izolálás beteghez kapcsolt vagy betegtől független paraméterei szerint.

3. Anyagok és Módszerek

A Debreceni Egyetem 10 különböző klinikájáról 63 db *C. albicans* izolátum (43 betegtől: egy beteghez egy vagy több izolátum is tartozott) állt rendelkezésünkre (DE KK, Orvosi Mikrobiológiai Intézet), melyeket 2013-ban és 2015-ben, különböző korú, nemű betegektől izoláltak. A betegek különféle és eltérő súlyosságú alapbetegségben szenvedtek. A *S. cerevisiae* élesztőgombából a klinikai izolátumok a Debreceni Egyetem klinikáiról származtak, illetve a Szegedi Tudományegyetem klinikái is bevonásra kerültek az izolátumok kis száma miatt. Összesen 12 *S. cerevisiae* klinikai izolátumot vizsgáltunk (egy beteghez egy izolátum tartozott). A fajazonosítás a klinikumban alkalmazott protokoll szerint MALDI-TOF tömeg-spektrometriás eljárással történt a DE Klinikai Mikrobiológiai intézetében.

Az izolátumok virulencia faktorainak vizsgálatainál alkalmazott módszerek

A *C. albicans* izolátumok hifázóképességét Spider tápagon határoztuk meg. A tenyészetek inkubálása 30 °C-on 10 napig zajlott. A 10. napon a hifázó gyűrű szélességének mérésével határoztuk meg a hifázó képesség mértékét (Fekete és mtsai. 2007, 2008).

A *C. albicans* izolátumok adhéziós képességének vizsgálatakor 96 lyukú mikrotiter lemezt használtunk. A sejtek műanyag felszínhez történő tapadását RPMI 1640, bikarbonátmentes, pH 7 médiumban vizsgáltuk meg. Előzetes inkubálás (37 °C) után, XTT-menadionnal történő ismételt inkubálás következett. A kolorimetriás változás alapján a letapadt sejtek

abszorbanciáját ($\lambda=490$ nm) mikrotiter lemezolvasó segítségével határoztuk meg (Ramage és mtsai. 2001).

Mindkét faj esetén alkalmaztuk a következő kísérleteket:

A foszfolipáz enzimaktivitásokat tojássárgája-tartalmú tápagon (Ibrahim és mtsai. 1995), míg az aszpartát proteáz enzimaktivitásokat BSA tartalmú tápagon Price és munkatársainak (1982) leírása szerint határoztuk meg. A tenyészeteket 30 °C-on inkubáltuk és a 3. napon méréseket végeztünk. Meghatároztuk a telepek körüli feltisztulás átmérőjéből az ún. precipitációs zónahányados (továbbiakban: Pz érték) értékét, amely a telep átmérő és a telep körüli feltisztulási zóna hányadosa. A Pz értékek 0-1 közötti értékeket vehetnek fel, amelyek fordított arányosságban vannak az enzimaktivitással (1/Pz): minél kisebb a Pz érték, annál nagyobb enzimaktivitásra következtethetünk (Kantarcioglu és Yücel 2002).

A hemolitikus aktivitás meghatározásához birkavért tartalmazó, dextrózban gazdag táptalajon, 37 °C-on 3 napig inkubáltuk 5% CO₂ jelenlétében a tenyészeteket. A telep körüli hemolitikus zóna átmérőjének mérésével hemolitikus indexeket (továbbiakban: HI) határoztunk meg (Luo és mtsai. 2001).

A magas hőmérsékleten történő szaporodás vizsgálatához a *C. albicans* izolátumokat SDA tápagon tenyésztettük, amelyeket 3 napon át inkubáltunk 42°C-on. A különálló telepek átmérőit lemérve meghatároztuk az izolátumok szaporodásának mértékét (Fekete és mtsai. 2008). A *S. cerevisiae* izolátumok 40, 41 és 42°C-on történő szaporodásának vizsgálatához De Llanos és munkatársai (2006) által kidolgozott módszerét alkalmaztuk. YPD táptalajra felcseppentéseket végeztünk és 3 nap inkubálást követően vizuálisan értékeltük a telepek növekedésének mértékét.

A minimális gátló koncentráció (továbbiakban: MIC) meghatározását két antifungális szert: az amphotericin B-t (AmB) és a flukonazolt (Flu), valamint az MSB, oxidatív stresszt okozó ágenst alkalmazva végeztük el. A Flu és AmB szerekkel szembeni érzékenység vizsgálatánál az izolátumok szaporítása bikarbonáttól

mentes RPMI-1640 (pH 7.0) tápoldatban, míg MSB tolerancia meghatározása SDB tápoldatban történt 96 lyukú mikrotiter lemezben. Az alkalmazott koncentráció intervallumok: Flu esetén: 0,128-64 µg/ml, AmB esetén: 0,007-4 µg/ml, míg MSB esetén 0,3-1,3 mM közé estek. A MIC meghatározások és a referencia törzsek használata az élesztők antifungális szerekek szembeni érzékenység meghatározásához alkalmazott referencia módszer leírása szerint történt („Clinical and Laboratory Standards Institute”, CLSI 2008, M27-A3 protokoll alapján).

Az ABC genotípusok meghatározása a *C. albicans* izolátumoknál

Az egyes élesztő izolátumok kolóniáiból Hanna és Xiao (2006) módszerét alkalmazva izoláltunk genomi DNS-t. A genotipizáláshoz McCullough és mtsai. 1999 által alkalmazott primerpárokat használtuk. PCR alkalmazása után a genotípusok azonosítását agaróz gélelektroforézissel végeztük el. A 25S riboszoszomális DNS ismétlődésekben előforduló egyik transzpozábilis intron hiánya (A: 450 bp), jelenléte (B: 840 bp), részleges jelenléte (C: 450+840 bp) alapján 3féle genotípust különítettünk el (McCullough és mtsai. 1999).

Statisztikai analízis a *C. albicans* izolátumok vizsgálatainak eredményeire

Vizsgálataink szempontjából az izolátumokat olyan metapopulációként értelmeztük, amelyek izolálást lehetővé tevő számban jelen vannak az egyes anatómiai helyeken, adott időpontban. A statisztikai analízisek R interaktív statisztikai

környezetben (3.1.1. verzió) (R Core Team, 2014) valamint lme4 (1.1-109 verzió) (Bates és mtsai. 2014) és ImerTest csomag (2.0-29 verzió) (Kuznetsova és mtsai. 2015) alkalmazásával készültek el.

Összehasonlító klaszteranalízissel AGNES („Agglomerative Nesting”) dendrogramot (**1. ábra**) hoztunk létre, hogy megtudjuk van-e összefüggés a *C. albicans* izolátumok fenotípusos tulajdonságai között. Azok a tulajdonságok, amelyek közös ágból indulnak, hasonlítanak egymáshoz és minél feljebb van az adott tulajdonságok találkozási pontja, úgy azok egyre kevésbé hasonlóak egymáshoz.

Kevert hatású linearizált modellt alkalmaztunk (LMM: „Linear mixed- effects model”), hogy következtetni tudjunk a mintavételi körülmények és az ABC genotípusok, valamint a fenotípusos tulajdonságok és a gomba előfordulása közötti kapcsolatra.

A mért értékek normalizálása után a fenotípusos tulajdonságok esetleges csoportosulásainak felfedése érdekében hő térképet készítettünk („heat map”). A hő térkép mellé Ward-féle módszert alkalmazva fenotípusos dendrogramot készítettünk, amely mellé az izolátumok azonosítószámát, eredetét (anatómiai helye) és a klinikát, ahonnan az izolátum származik illetve az adott izolátum genotípusát tüntettük fel (**2. ábra**).

A *S. cerevisiae* izolátumokból a vizsgálataink ideje alatt összesen 12 izolátum gyűlt össze a debreceni és a szegedi egyetemi klinikák bevonásával is, így az adatsor nem volt alkalmas a statisztikai analízisek elvégzésére.

4. Eredmények és megbeszélésük

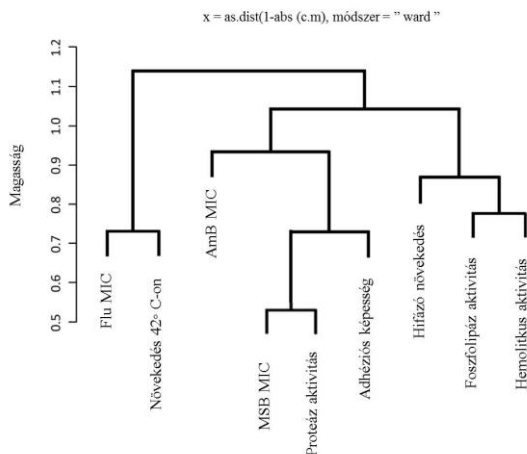
A 63 klinikai *C. albicans* izolátum és 12 *S. cerevisiae* klinikai izolátum fenotípusos tulajdonságait, virulencia faktorait vizsgáltuk meg. A továbbiakban *C. albicans* izolátumok hifázó képességének, inert felszínhez történő adhéziójának vizsgálatára kapott eredményeket, valamint a *C. albicans* és a *S. cerevisiae* izolátumok hidrolitikus enzimaktivitás, hemolitikus aktivitás, magas hőmérsékleten való szaporodás és az antifungális szerekkel és MSB-vel szembeni érzékenység meghatározására kapott eredményeket mutatjuk be, valamint a *C. albicans* izolátumok ABC genotípusait, valamint ezen izolátumoknál az eredményeinken alapuló statisztikai elemzést. A *S. cerevisiae* izolátumok kis száma miatt statisztikai analízisre nem volt alkalmas az adatsor, így ezeknél az izolátumoknál az említett kísérletek eredményeiről írok.

A *C. albicans* izolátumok hifázó növekedésének mértéke 10 % és 50 % között volt a teljes telep (100 %) átmérőjéhez képest. Az inert felszínhez történő adhéziós képességének vizsgálatakor 0,125-0,5 közé eső abszorbancia értékeket mértünk (négyeszeres különbség). Ez a kísérlet a *S. cerevisiae* izolátumokra nem volt adaptálható. A *C. albicans* izolátumok foszfolipáz enzimtermeléséből számolt Pz értékek 0,817-0,516 között voltak, míg a *S. cerevisiae* izolátumoké 0,83- 0,43 közé esett és a 12 izolátumból egy egyáltalán nem volt képes szaporodásra ezen táptalajon. A *C. albicans* izolátumok proteáz enzimtermeléséből számolt Pz értékek 0,847-0,41 között mozogtak, a 63 izolátumból 52-nek 0,7 alatt volt a Pz értéke, vagyis nagyon nagy aktivitással voltak jellemezhetőek. A 12 *S. cerevisiae* izolátum proteáz enzimtermeléséből számolt Pz értékek 0,62- 0,4 között változtak. Az izolátumok hemolitikus aktivitásának vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy három nap után minden izolátum képes volt a hemoglobin teljes bontására, vagyis β -hemolízisre. A *C. albicans* izolátumok HI indexei 1,1 és 1,9 közötti intervallumba estek, míg a *S. cerevisiae*

izolátumoknál 1,76 és 2,38 közé. A magas hőmérsékleten való szaporodás vizsgálatánál a *C. albicans* gombák 42 °C-on hasonló mértékben szaporodtak (62 izolátumnál 1,9-6,7 mm, csak 1 izolátumnak volt kisebb, 0,9 mm a telepátmérőinek átlaga). A *S. cerevisiae* élesztők 41 és 42 °C-on nem szaporodtak, de 40 °C-on szaporodásukat megfigyelve, 5 izolátum jól látható, erőteljes (+) növekedést mutatott, míg 7 izolátumnál gyengébb mértékű (+-) növekedést tapasztaltunk. Az izolátumok antifungális szerekkel és oxidatív stresszt okozó szerrel szembeni érzékenysége a következőképpen alakult: A *C. albicans* izolátumok fungisztatikus szerrel, flukonazol esetén (Flu) kapott MIC értékei 0,125 és 2 µg/ml között voltak. Az amphotericin B (AmB) fungicid szerrel szembeni érzékenységek MIC értékei 0,063 µg/ml és 1 µg/ml közé estek. A 12 *S. cerevisiae* izolátum antifungális szerekkel szembeni érzékenysége mind a két antifungális szert, mind pedig az oxidatív stresszt okozó szert tekintve hasonló mértékű volt. Az AmB esetén minden *S. cerevisiae* élesztő 0,25 µg/ml vagy 0,5 µg/ml koncentrációig tolerálta az AmB-t, kivéve egy izolátumot, amely csak 0,06 µg/ml-ig tolerálta ezt a fungicid szert. A *C. albicans* izolátumok MSB toleranciája 0,7 és 1,3 mM között volt, de egy izolátum már a legkisebb, 0,6 mM koncentrációnál sem tolerálta az MSB-t. A *S. cerevisiae* izolátumok MSB-re meghatározott MIC értéke – a szaporodásra jelen körülmények között nem képes izolátumon kívül – 11 izolátum esetén egy szűk intervallumba esett: 0,4 mM és 0,7 mM között változott. Két izolátum MIC értéke 0,4 mM, négy izolátumnak 0,5 mM, két izolátumnak 0,6 mM és három izolátumnak 0,7 mM volt. A *C. albicans* izolátumokra elvégzett ABC genotipizálás eredményeképpen azt kaptuk, hogy az izolátumok számottevő többsége B genotípusú (28 izolátum, az izolátumok 44,4 %-a). Az izolátumok 39,7 %-a, tehát 25 izolátum A genotípusú volt és csupán 15,9 %-uk volt C genotípusú, amely 10 izolátumot foglal magába. Az egy-egy adott betegtől származó izolátumok egyféle genotípusúak voltak egy beteg kivételével, akinél egyaránt találtunk A, B és C genotípusú *C. albicans* izolátumokat, amelyek sebből és a

hasüregből származtak. Ezen eredmények összeethetők Chaves és munkatársai megfigyeléseivel (2012), akik szintén különböző genotípusú izolátumokat találtak olyan betegeknél, akik *Candida*-fertőzésben de nem kandidémiában szenvedtek.

A statisztikai analízist fenotípusos tulajdonságok összehasonlításával kezdtük. Klaszteranalízis segítségével AGNES („Agglomerative Nesting”) dendrogramot készítettünk (**1. ábra**), amely alapján megtudtuk, hogy a vizsgált fenotípusos tulajdonságok között nincs szignifikáns összefüggés, gyenge korreláció áll fenn (**1. ábra**). A továbbiakban az analízist ezért úgy folytattuk, hogy a kilenc fenotípusos paramétert és az ABC genotípusokat egyesével vetettük össze a betegfüggő és betegtől független tényezőkkel, amelyek között külön-külön állapítottuk meg, hogy szignifikáns kapcsolat áll-e fenn (**1. táblázat**).



1. ábra: A hierarchikus klaszterezési eljárással készült AGNES dendrogram, amelyen a kilenc fenotípusos tulajdonságot láthatjuk

	A	B	C	Hifázó növekedés	Adhézió	Proteáz aktivitás	Foszfolipáz aktivitás	Hemolízis	AmB MIC	Flu MIC	MSB MIC	Növekedés 42° C-on
	Genotípus											
Kórházi osztály	.	.	.	*	.	.	.	.	.	.	.	.
Iz. anatómiai forrása	.	.	.	.	.	.	.	***	.	.	.	.
A genotípus				.	.	.	.	.	.	.	.	.
B genotípus				.	.	.	**, ↗	.	**, ↗	.	.	.
C genotípus				.	.	.	***, ↗	.	.	.	.	.

(●: $p < 0,1$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)

Az ABC genotípusok eloszlása és azoknak összefüggése a betegtől függő és azoktól független faktorokkal és ennek jelentősége:

1.) A genotípusokkal csak néhány fenotípusos tulajdonság mutat szignifikáns összefüggést (foszfolipáz aktivitás, AmB MIC) [hasonlóan Sardi és mtsai. (2012) és Inci és mtsai. (2012) kutatási eredményeihez].

2.) Nem jellemző egyik ABC-genotípus csoportra sem, hogy kizárólag adott fenotípusos tulajdonságai vannak.

3.) Szisztémás gombafertőzéseknel általában egy-egy beteg szervezetét egyféle genotípusú élesztők kolonizálják. Tanulmányunkban kilenc beteg közül kettőnél A genotípusú izolátumok, öt betegnél B genotípusú, míg 1 betegnél csak C genotípusú izolátumokt azonosítottuk, egy beteg esetén mindhárom genotípus megtalálható volt [hasznlóan Chaves és munkatársainak (2012) eredményeihez].

4.) Néhány szignifikáns korreláció van a genotípusok és a betegfüggő faktorok között (beteg kora, neme, alapbetegség súlyossága).

5.) Az ABC genotípusok nem csoportosulnak sem a betegtől függő sem a betegtől független paraméterek szerint, mindhárom genotípus előfordulhat bárhol az emberi szervezetben [hasznlóan McCullough és mtsai. (1999); Tavanti és mtsai. (2005), valamint Takakura és mtsai. (2008) megállapításaihoz].

A *C. albicans* izolátumok betegfüggő és betegtől független tulajdonságainak összefüggése a vizsgált fenotípusos paraméterekkel

1.) A betegtől független faktorokkal (év, hónap) 7 fenotípusos tulajdonság függ össze: a hifázó- és adhézios képesség, a Flu és MSB tolerancia, a foszfolipáz- és proteáz enzimaktivitások és a hemolitikus aktivitás. Ebből három tulajdonság (adhézios képesség, proteáz aktivitás, Flu tolerancia) csak betegtől független faktorokkal (év, hónap) volt összefüggésben.

2.) Csupán betegfüggő faktorokkal 2 fenotípusos tulajdonság korrelált: a hemolitikus aktivitás és az AmB tolerancia.

3.) Egy fenotípusos tulajdonság, a magas hőmérsékleten való szaporodás nem mutatott kapcsolatot sem betegtől független, sem attól függő paraméterrel.

4.) Három fenotípusos tulajdonság volt összefüggésben mind betegtől független és azoktól függő faktorokkal egyaránt: a hifázó képesség, a foszfolipáz aktivitás és az MSB tolerancia.

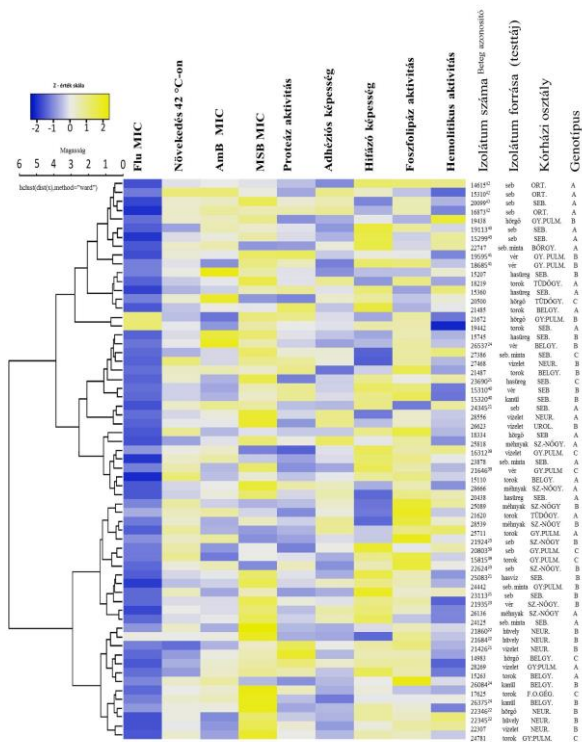
5.) Niche-specializáció nem figyelhető meg, egyik fenotípusos tulajdonság vagy beteg függő vagy attól független tulajdonság szerint sem csoportosulnak jelentősen a *C. albicans* izolátumok.

6.) Az eltérő időpontokban izolált *C. albicans* izolátumok különböző fenotípusa a *C. albicans* metapopuláció dinamikus, állandóan változó természetét mutatja a vizsgált betegek különböző testtájaiban e szűk földrajzi területen (egy város egy klinikája) [Odds és munkatársaihoz hasonlóan (2006; 2007) számos földrajzi területről származó *C. albicans* izolátumoknál].

A *C. albicans* fenotípusos tulajdonságainak vizuálizálása

Ahhoz, hogy megtudjuk, hogy a *C. albicans* izolátumok kilenc vizsgált fenotípusos tulajdonságuk szerint hogyan csoportosulnak, vizuális ábrázolás céljából elkészítettük egy ún. hőtérképet („heat map”) (2. ábra), valamint egy hozzá tartozó fenotípusos tulajdonságokra vonatkozó dendrogramot. A 63 *C. albicans* izolátum három fő kládba csoportosul, viszont nem figyelhető meg semmiféle klasztereződés az izolátumok eredete szerint. Minden klaszter tartalmaz különböző anatómiai helyről (testrész, testtáj) származó és különböző genotípusú izolátumokat, valamint egy-egy klaszterben egy-egy betegtől származó

izolátumokat (40; 41; 42; 43. beteg) is találhatunk, vagy épp külön klaszterbe is tartozhatnak az egy betegtől származó izolátumok (21; 22; 23; 24; 39. beteg). Ezek alapján a fenotípusos tulajdonságaikban különböző, változatos *C. albicans* izolátumok előfordulását tudtuk igazolni (2. ábra).



2. ábra: Hőterkép.

A fenotípusos tulajdonságok vizualizálása az izolátum számának, felső indexben a beteg azonosítójának, az izolátum forrásának (testrészt vagy testtáj), a kórházi osztálynak ahol az izolálás történt és az ABC genotípusaiknak a feltüntetésével

A *S. cerevisiae* klinikai izolátumok fenotípusos és virulencia faktorainak vizsgálatainak megbeszélése

A *S. cerevisiae* klinikai izolátumok, kevés elemszámuk miatt statisztikai elemzésre nem voltak alkalmasak. Ennek hiányában méréseink alapján a következő megállapításokat tettük:

- 1.) Ilyen kevés mintaszám esetén nem vonható le egyértelmű következtetés, de a *S. cerevisiae* izolátumok vizsgálataink eredményei szerint fenotípusos tulajdonságaikban változatosak.
- 2.) Egyes virulencia faktoraik nagymértékben hasonlítanak a bizonyítottan opportunistá patogén *C. albicans* tulajdonságaira.

5. Összefoglalás és Tézisek

Munkánk során a Debreceni Egyetem klinikáiról, különböző korú és nemű, eltérő alapbetegségekben szenvedő betegektől származó 63 *C. albicans* klinikai izolátum és a Szegedi Tudomány Egyetem bevonásával 12 *S. cerevisiae* izolátum fenotípusos tulajdonságait vizsgáltuk meg. A *C. albicans* izolátumok kilenc fenotípusos tulajdonságát, illetve virulencia faktorait: a hifázó növekedést, az adhéziós képességet, a hidrolitikus enzimaktivitásokat, a hemolitikus enzimaktivitásokat, a magas hőmérsékleten történő szaporodást, két antifungális szerrel és egy oxidatív stresszt okozó szerrel szembeni érzékenységet, valamint ABC genotípusaikat határoztuk meg. A *S. cerevisiae* izolátumoknál pedig dolgozatomban a hidrolitikus enzimaktivitások, a hemolitikus aktivitások, a magas hőmérsékleten történő szaporodás, két antifungális-, és egy oxidatív stresszt okozó szerrel szembeni érzékenységre vonatkozó eredményeket tárgyaltuk. Az említett kísérletek után a *C. albicans* izolátumokra statisztikai analízist végeztünk.

Új tudományos eredmények felsorolása:

1. A *C. albicans* gomba fenotípusos tulajdonságai a betegtől független tulajdonságokkal (az izolálás éve és hava) több esetben mutattak összefüggést, mint a betegfüggő tulajdonságokkal (az izolátum anatómiai eredete, beteg kora, neme, alapbetegsége, kórházi osztály ahol az izolálás történt), illetve az ABC genotípusokkal. Általában nem kolonizálnak az egyes fenotípusos jellemzőjű *C. albicans* izolátumok nagyobb eséllyel egy-egy testrészt vagy testtáját.

2. A gomba korábbiakban felsorolt, egyes fenotípusos tulajdonságai között nincs szignifikáns összefüggés, vagyis a gomba egy-egy fenotípusos tulajdonságának vagy virulencia faktorának mért értéke nem korrelál más tulajdonságok mért értékével.

3. Az ABC genotípusok nem mutattak anatómiai specializációt és előfordulásuk csak néhány betegfüggő paraméterrel korrelált. Az ABC genotípusok csak néhány fenotípusos tulajdonsággal (foszfolipáz aktivitás, AmB tolerancia) vannak szignifikáns összefüggésben.

4. A *S. cerevisiae* klinikai izolátumok általunk vizsgált fenotípusos tulajdonságaira kapott értékek különböznek egymástól és változatosak, amiből viszonylag dinamikus és diverz populációjuk meglétére következtethetünk az emberi szervezetben.

A kísérleteink ideje alatt, még a Szegedi Tudományegyetem klinikájának bevonásával is kevés *S. cerevisiae* izolátum gyűlt össze, ezért ez az adatsor nem volt alkalmas a statisztikai analízis elvégzésére. Ugyanakkor ezek az eredmények egy, a klinikai és élelmiszeripari illetve probiotikumokból származó törzspárok geno- és fenotípusos tulajdonságait összehasonlító tanulmányunkban publikálásra kerültek. Ebben a tanulmányban a klinikai és nem-klinikai *S. cerevisiae* izolátumok vizsgálatánál azt tapasztaltuk, hogy az élelmiszeripari vagy probiotikumból származó törzsek a szervezetbe bekerülve mikroevolúciós változásokon mennek keresztül és geno-, és fenotípusos tulajdonságaik folyamatos szelekciós nyomásnak vannak kitéve. Az általunk vizsgált klinikai *S. cerevisiae* izolátumok genetikai vizsgálataink alapján visszavezethetőek voltak élelmiszeripari vagy probiotikumból származó őseikre. Eredményeinkből arra következtettünk, hogy az élelmiszeripari *S. cerevisiae* gombák mikroevolúciós változások révén néhány esetben kommenzalistaként tudnak adaptálódni.

Az itt összefoglalt munkámban alkalmazott újszerű megközelítés hozzájárulhat az opportunistá patogén gombák vagy esetlegesen patogénné alakuló gombák tulajdonságainak átfogó vizsgálatához. A jövőben érdemes lenne az általunk vizsgált izolátumok tulajdonságait összevetni más városokból, akár más országokból vagy kontinensről származó klinikai izolátumok tulajdonságaival és így megfigyelni tágabb geográfiai eloszlásban is ezeknek a gomba populációknak a diverzitását, nagyfokú változatosságát. Továbbá evolúciós megközelítéssel, niche specializációt szem előtt tartva érdekes lenne megfigyelni, hogy milyen más paraméterek vagy tulajdonságok alapján csoportosulhatnak, alakíthatnak ki klasztereket ezek a fajok. Végül, mivel napjainkban egyre nagyobb százalékban fordulnak elő a nem-*albicans* fajok is, mint súlyos invazív gombás fertőzések okozói, égető fontosságú ezeknek a fajoknak és más kommenzalistaként élő, esetlegesen patogénné válni képes fajok mélyebb szintű és több szempontból való tanulmányozása.

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni Prof. Dr. Pócsi István Témavezetőmnek és egyben a DE-TTK Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tette Doktori munkám elvégzését a Tanszéken, valamint tapasztalatait megosztotta és hasznos tanácsaival mindvégig támogatta kutatásomat.

Szeretném megköszönni Dr. Pfliegler Valter Péter Szerzőtársam lelkiismeretes munkáját, és önzetlen segítségét valamint, hogy szaktudását átadva végigkísért ezen az úton.

Köszönöm, hogy Dr. Majoros László és Dr. Kovács Renátó (DE-KK-ÁOK Orvosi Mikrobiológiai Intézet) a klinikai *C. albicans* izolátumokat és *S. cerevisiae* izolátumokat rendelkezésünkre bocsájtotta a szükséges információkkal és az antifungális szerek érzékenységeinek vizsgálatához nyújtott segítségüket, valamint Dr. Urbán Editnek (Szegedi Tudományegyetem, Klinikai Mikrobiológia Diagnosztikai Intézet) a szegedi *S. cerevisiae* klinikai izolátumokért és Zsuga Imre szakdolgozónak, aki a *S. cerevisiae* izolátumok vizsgálatában segítségünkre volt, valamint Tóth Judit szakdolgozómnak a *C. albicans* izolátumok előkísérleteiben való segítségéért.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Barta Zoltánnak (DE-TTK Evolúciós Állattani és Humánbiológiai Tanszék) a *C. albicans* izolátumok vizsgálataira kapott eredmények statisztikai analíziséért és együttműködő, segítőkész munkájáért.

Köszönöm a Tanszék minden dolgozójának, különösen Dr. Jakab Ágnesnek a kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségét, valamint Vassné Orosz Erzsébetnek, Király Anitának és Tóth Gábor Lászlóné asszisztensnek, hogy munkámat kellemes környezetben, barátok közt végezhettem.

Végül hálásan köszönöm férjemnek és családom többi tagjainak, barátaimnak, hogy mindvégig bíztattak és támogattak.

7. Introduction

Candida albicans is the best-studied opportunistic pathogenic yeast fungus. As a member of normal human microflora, it is also present in the healthy human body, in the oral cavity, in the gastrointestinal tract and also on the mucous membrane of female genital tract. In weakened immune states, it can cause more serious infections affecting different organs or the whole human host (candidiasis), even bloodstream infections (candidaemia) (Brown et al. 2012). Invasive fungal infections are caused by *Candida* species in most cases (80-90%), the most commonly isolated species in the clinic (in more than 50%) being *C. albicans* (Sardi et al. 2013). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a microbe that has been used by humanity in brewing, winemaking and in the bakery industry (McGovern et al. 2004, Yáñez et al. 2009), the consumption of which as food or nowadays as a probiotic (*S. cerevisiae* 'var. *boulardii*') may be beneficial (Moyad 2007; Ghannoum et al. 2010). However, there have been cases where *S. cerevisiae* caused fungal infections (Smith et al. 2002, Enache-Angoulvant 2005).

C. albicans is a widespread species all over the world, thus many studies have dealt with its diversity in some geographic areas. The investigation of clinical *C. albicans* isolates on a global level were primarily reported by Odds and co-workers (2006, 2007), who demonstrated a large diversity of these populations of this fungus.

The yeast *S. cerevisiae* is generally recognised as safe, but it is still not known whether its colonization of the human body is temporary or permanent, neither are the causes the mycoses uncovered (Goldstein és McCusker 2001; Strope és mtsai. 2015). The phenotypic and genotypic attributes of *S. cerevisiae* that might be responsible for enabling this species to act as an opportunistic pathogen have been studied by Anoop et al. (2015), who found that

these properties are often very similar in non-clinical and clinical *S. cerevisiae* isolates.

Certain properties of pathogenic fungi that help them in the process of infection are called virulence factors (e.g. Hube 2004; Mayer et al. 2013). The most important virulence factors are: the capability of yeast↔hyphal transition, the adhesion ability of the fungal cells and the formation of a biofilm, the production of hydrolytic enzymes as aspartic protease and phospholipase, and their ability to grow at high temperature (Hube 2004; Höfs et al. 2016). These factors are studied and compared, which may help in gaining a deeper insight into the occurrence of different fungi, and their potential clustering according to these features.

8. Objectives

Our aim was to investigate the phenotypic features of the clinical *C. albicans* and *S. cerevisiae* isolates as well as the ABC genotypes of the former species in a geographically narrow area, to get an insight into how diverse the different yeasts are in a well-defined area, in a single clinic. We aimed to assess which genetic and phenotypic properties characterize the isolated yeasts in different patients and in different anatomical locations. In our studies, the isolates were interpreted as representatives of a metapopulation present in a given anatomical site in numbers enabling isolation at a given time. The date of sampling (years, months: patient-independent factors) was important to us to assess whether features of *C. albicans* yeasts isolated at a given time significantly correlate with ABC genotypes and patient-dependent factors (body site or anatomical source, patients' age, sex, disease severity, clinical care unit of isolation). We assumed that fungi possessing different properties during a certain period of the year may be isolated, indicating that the yeasts occurring in the clinic change dynamically.

In our study, we started with investigating clinical *C. albicans* and *S. cerevisiae* isolates' phenotypic properties. Our aim was to compare the phenotypes, virulence factors, and to find out whether isolates are clustered according to their phenotypic properties, and if they do, how. Furthermore, we planned an assessment of potentially significant correlations of phenotypic properties, ABC genotypes and patient-dependent properties (body site or anatomical source, patients' age, sex, disease severity, clinical care unit of isolation) of the *C. albicans* isolates recovered at a given time.

Following experiments were planned: assessing the hyphal growth ability for *C. albicans*; for both species, assesment of the adhesion ability to plastic surface; measuring hydrolytic enzyme activities, hemolytic activities; testing growth at high temperature;

and the susceptibility of the fungi to two antifungals and one oxidative stress agent. In addition, the determination of *C. albicans* isolates' ABC genotypes was included among our plans.

We aimed to find the answers to the following questions:

- 1.) Whether *C. albicans* fungi isolated at a given time (year, month) possessing certain phenotypic properties show any anatomical preference (whether it is colonizing a particular body part or body area), and whether clustering is detectable according to patient-dependent properties (patient age and sex, patients' underlying disease and disease severity, clinical care unit of isolation).
- 2.) Whether there is correlation among the previously listed phenotypical features and virulence factors we investigated, as well as among the phenotypical features and genotype (ABC genotypes).
- 3.) Do ABC genotypes cluster according to the patient-dependent (anatomical source or body site, patients' age, sex, disease severity, clinical care unit of isolation) or patient-independent (year and month of the isolation) parameters?
- 4.) Is there a correlation between investigated phenotypical features of *S. cerevisiae* clinical isolates, and do the isolates cluster into groups according to the patient-related or patient-independent parameters of the isolation?

9. Materials and Methods

We obtained 63 *C. albicans* clinical isolates (43 patients: each patient with one or more isolates) from 10 different clinics of the University of Debrecen (UD, Medical Microbiology Institute). Isolates originated from a broad range of patients of different age and sex, from the years 2013 and 2015. These patients suffered from several underlying diseases. Besides the *S. cerevisiae* clinical isolates originating from University of Debrecen, isolates from the University of Szeged have also been included because of the small number of isolates. In total 12 *S. cerevisiae* clinical isolates were examined (each patient with one isolate). Identification of the species was performed by MALDI-TOF mass spectrometry according to clinical protocol in the Institute of Clinical Microbiology, UD.

The methods used for testing virulence factors of the isolates

The ability of hyphal growth of *C. albicans* isolates was determined on Spider agar media. The cultures were incubated at 30 °C for 10 days. On the 10th day, the extent of hyphal formation was calculated by measuring the width of hyphal ring (Fekete et al. 2007, 2008).

We used 96-well microtiter plates for investigation of *C. albicans* isolates's adhesion ability. The adhesion of the cells to inert surface was tested in bicarbonate-free, pH 7 RPMI1640 medium. After preincubation (37 °C), incubation with XTT-menadione followed. Based on colorimetric changes the absorbances ($\lambda=490$ nm) of adherent cells was determined by using micotiter plate reader (Ramage et al. 2001).

The following experiments were applied for both species: the phospholipase activities were tested on Egg Yolk agar (Ibrahim et al. 1995), while bovine serum albumin (BSA) were used to measure aspartic protease activities (Price et al. 1982). The cultures were incubated at 30 °C for 3 days. The colony diameters and the colony+precipitation zones were measured and the precipitation zones (Pz) were determined. The Pz values may fall between 0 and 1 (Pz=1 means zero enzymatic activity) (Kantarcioğlu és Yücel 2002).

For the determination of hemolytic activity, dextrose-enriched sheep blood agar was used. The cultures were incubated at 37 °C for 3 days in 5% CO₂ atmosphere. Hemolytic index was determined by measuring the diameter of the hemolytical zone around the colonies (Luo et al. 2001).

For examination of *C. albicans* isolates' growth at high temperature we used SDA media, which were incubated at 42°C for 3 days. The capability of growth was determined by measuring diameters of individual colonies (Fekete et al. 2008). For *S. cerevisiae* isolates' growth at 40, 41 and 42°C we used the method from De Llanos et al. (2006). Isolates were inoculated onto YPD plates and after 3 days incubation the extent of colony growth was assessed visually.

The minimal inhibitory concentration (MIC) values were determined for two antifungal drugs: amphotericin B (AmB) and fluconazole (Flu) and for one oxidative stress generating agent, menadione sodium bisulphite (MSB). For susceptibility testing for Flu and AmB we used bicarbonate-free RPMI 1640 (pH 7) medium, while for determination of MSB MIC values, isolates were grown in SDB medium. Broth microdilutions were carried out in 96-well microtiter plates. The following concentration ranges were used: 0.128-64 µg/ml for Flu, 0.007-4 µg/ml for AmB and 0.13-113 mM for MSB. The determinations of MIC values and use of reference strains were set according to the Reference method for broth microdilution antifungal susceptibility testing of yeasts („Clinical and Laboratory Standards Institute”, CLSI 2008, based on M27-A3 protocol).

Determination of ABC genotypes for *C. albicans* isolates

Genomic DNA was extracted from the yeasts' colonies according to Hanna and Xiao (2006). Genotyping was performed with the primers of McCullough et al. (1999). After PCR, the genotypes were identified by agarose gel electrophoresis. Based on the lack of (A: 450 bp), presence of (B: 840 bp), and partial presence of (C: 450+840 bp) the transposable intron occurring in the 25S ribosomal tandem DNA repeats, 3 different genotypes were identified (McCullough et al. 1999).

Statistical analysis for results of investigations of *C. albicans* isolates

In our studies, isolates were interpreted as a metapopulation that is presented in certain anatomical sites at a given time in numbers high enough to enable isolation. The statistic analyses were performed in the R interactive statistics environment (version 3.1.1.) (R Core Team, 2014) and Ime4 (version 1.1-109) (Bates et al. 2014) and ImerTest packages (version 2.0-29) (Kuznetsova et al. 2015).

We generated an AGNES („Agglomerative Nesting”) dendrogram (**Figure 1**) using comparative hierarchical clustering to detect whether there is a correlation among the phenotypic features of the *C. albicans* isolates. Those properties which start from a common branch are correlated to each other and the higher the properties' joining points, the less correlated they are to each other.

We used a linear mixed-effects model (LMM) to assess the correlations among sampling conditions, ABC genotypes and phenotypic properties and fungal occurrences. After the phenotypic measurements had been normalized, we generated a heat map in order to check the possible clustering according to phenotypical

features. Ward's method was applied to produce a phenotypic dendrogram, which was added to the heat map. We represented some data next to the heat map: the ID numbers of the isolates, the anatomical sources (body parts), the clinic from which the isolate came from and the genotypes of the isolates (**Figure 2**).

A total of 12 *S. cerevisiae* isolates were obtained from the university clinics of Debrecen and with the involvement of the University of Szeged too. Thus, the data was not suitable for performing the statistic analysis.

10. Results and discussion

We investigated the phenotypic features and virulence factors of 63 clinical *C. albicans* isolates and 12 *S. cerevisiae* isolates. We present our results on the *C. albicans* and *S. cerevisiae* isolates' hydrolytic activities, hemolytic activities, growth at high temperature, and their susceptibility to two antifungal and MSB, the ABC genotypes of *C. albicans* isolates, and also the statistical analysis for these isolates. Due to the small number of *S.cerevisiae* isolates, the data was not suitable for statistical analysis, therefore I merely present the results of the aforementioned experiments for these isolates (without statistics).

The extent of hyphal growth of *C. albicans* was between 10% and 50% compared to the total colony (100%) diameter. We measured 0.125-0.5 absorbance values for their capability of adhesion to inert surfaces (fourfold differences). This experiment was not adaptable to *S. cerevisiae* isolates. The Pz values calculated from the *C. albicans* isolates' phospholipase enzyme productions were between 0.817-0.516, while those of the *S. cerevisiae* isolates were between 0.83-0.43, and one of the 12 isolates was unable to grow on this medium. The Pz values calculated from the *C. albicans* isolates' protease enzyme productions were between 0.847-0.41 and 52 isolates from the 63 showed very low Pz (0.7>) (referring to very high activity).

The Pz values calculated from the 12 *S. cerevisiae* isolates' protease enzyme productions were in a range of 0.62 to 0.4. Tests of hemolytic activities showed that all isolates displayed β -hemolysis (complete lysis of hemoglobin). The *C. albicans* hemolytic indices ranged from 1.1 to 1.9, while for the *S. cerevisiae* isolates, these values were between 1.76-2.38. *C. albicans* isolates showed similar growth capabilities at 42 °C (for 62 of the 63 isolates, average colony diameters were 1.9-6.7 mm and much smaller, 0.9 mm in the case of only one isolate). The *S. cerevisiae* isolates were not able to

reproduce at 41 and 42°C, so we observed their growth at 40°C and 5 isolates showed visible, strong growth (+), while 7 isolates showed markedly reduced growth (+-). The susceptibilities to antifungal agents and the oxidative stress agents were as follows: the MIC values for the fungistatic agent fluconazole (Flu) were between 0.125 µg/ml and 2 µg/ml, while the MIC values for amphotericin B (AmB) ranged from 0.063 µg/ml to 1 µg/ml. The susceptibility of the 12 *S. cerevisiae* isolates to antifungal agents and to the oxidative stress agent were similar. All of the *S. cerevisiae* isolates tolerated AmB to up to 0.25 or 0.5 µg/ml concentrations, except for one isolate that tolerated this fungicidal agent only to a concentration of 0.06 µg/ml. The MSB MIC values of the *C. albicans* isolates were between 0.7-1.3 mM, but one isolate was unable to tolerate the lowest concentration, 0.6 mM. The MSB MIC values of the *S. cerevisiae* isolates – except for one isolate which was unable to reproduce under these circumstances – in the case of 11 isolates fell into a narrow range (0.4 mM to 0.7mM). Two isolates' MIC values were 0.4 mM, for four isolates this value was 0.5 mM, for two isolates 0.6 mM and for three isolates the MIC values were 0.7 mM.

During the ABC genotyping performed on *C. albicans* isolates we found most of the isolates to have genotype B (28 isolates, corresponding to the 44.4% of the isolates). 39.7 %, or 25 isolates showed genotype A and only 15.9% of the isolates displayed genotype C (10 isolates). Multiple isolates from a single patient all showed the same ABC genotypes with one exception: one patient harboured every genotype (A, B and C). These latter isolates originated from a wound and from the abdominal cavity. This case is similar to Chaves et al. (2012)'s publication, who found that patients who did not develop candidaemia (only *Candida*-infection) always possessed isolates with several genotypes.

We started the statistical analysis by comparing the phenotypic features. Using cluster analysis we made an AGNES („Agglomerative Nesting”) dendrogram (**Figure 1**), which showed that there was no significant correlation, just weak correlations

among the examined phenotypic properties (**Figure 1**). Hence, the analysis was continued by comparing the nine phenotypic parameters and the ABC genotypes, one by one, with the patient-dependent and patient-independent factors. Among the factors mentioned above, we have determined whether there is a significant relationship (**Table 1**).

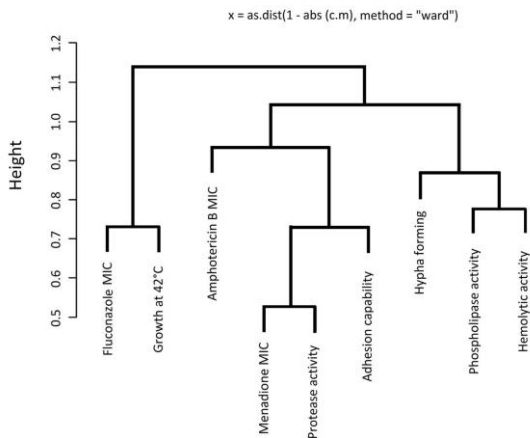


Figure 1.: AGNES dendrogram, made using hierarchical clustering, where the nine phenotypic fetures are visible

The the trends and different levels of significance for the correlations of phenotypic properties of *C. albicans* isolates, ABC genotypes, and the correlations between patient-dependent and patient-independent parameters are summarized in **Table 1**.

Table 1.: Significant correlations among the patient-dependent and isolation factors and *C. albicans* phenotypical features and genotypes

Care unit	Sampling month	Sampling year	Patient's sex	Severity of basic disease	Patient age	Genotype			Hyphal growth	Adhesion	Protease activity	Phosphol. activity	Hemolizis	AmB MIC	Flu MIC	MSB MIC	Growth at 42° C
						A	B	C									
-	-	-	**, female< male	*, ↘ with severity	*, ↗ with age				**, ↘ with age								
-	-	-	-	*, ↗ with severity	**, ↘ with age												
-	-	-	-	-	-												
*	-	*, 2013<2015	-	*, ↘ with severity													
-	-	***, 2013<2015	-	-	-												
-	-	***, 2013>2015	-	-	-												
-	*	**, 2013>2015	*, female< male	-	-												
-	*	-	-	-	-												
-	-	-	-	*, ↗ with severity	-												
-	*	**, 2013<2015	-	-	-												
-	-	*, 2013<2015	-	-	*, ↗ with age												
-	-	-	-	-	-												

	A	B	C	Hyphal growth	Adhesion	Protease activity	Phosphol. activity	Hemolizis	AmB MIC	Flu MIC	MSB MIC	Growth at 12° C
	Genotype											
Anatomical source	-	-	-	-	-	-	-	***	-	-	-	-
Genotype A				-	-	-	-	-	-	-	-	-
Genotype B				-	-	-	***, ↗	-	***, ↗	-	-	-
Genotype C				-	-	-	***, ↗	-	-	-	-	-

(●: $p < 0,1$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)

The distribution of ABC genotypes, correlations to patient-dependent and patient-independent factors, and the significance of these

1.) Only a few phenotypic features showed the significant correlation with genotypes (phospholipase activity, AmB MIC) [similarly to the results of Sardi et al. (2012) and Inci et al. (2012)].

2.) It is not characteristic to any of the ABC genotypes to possess only given specific phenotypic properties. For systemic fungal infections, usually one patient's organism is colonized by one genotype. In our study for such patients with multiple isolates, two from nine harboured genotype A, five patients harboured genotype B, while for one patient we determined only genotype C. All three genotypes were found in one patient [similar to Chaves et al. (2012) results].

4.) There are some correlations between genotypes and patient-dependent factors (patients' age, sex and severity of basic disease).

5.) ABC genotypes are clustered neither according to patient-dependent nor to independent parameters, and all three genotypes can occur anywhere in the human body [similarly to McCullough et al. (1999); Tavanti et al. (2005), and Takakura et al. (2008)].

The correlations of the investigated phenotypic features of *C. albicans* isolates to patient-dependent and patient-independent factors

1.) Seven phenotypic features were correlated to patient-independent factors (year, month): the ability of hyphal growth, adhesion, Flu and MSB tolerances, phospholipase and protease enzyme activities, and the hemolytic activity. Three properties (adhesion capability, protease activity and Flu tolerance) of these are correlated only to patient-independent factors (year, month).

2.) Two phenotypic properties correlated only to patient-dependent factors: hemolytic activity and AmB tolerance.

3.) One phenotypic feature, the growth at high temperature did not show any correlation to patient-independent or patient-dependent parameters.

4.) Three phenotypic traits were correlated to both patient-independent and dependent factors: the ability to hyphal growth, phospholipase activity and MSB tolerance.

5.) Niche specialization could not be observed: the *C. albicans* isolates were not clustered according to a specific phenotype or according to patient-dependent or independent factors.

6.) The *C. albicans* isolates isolated at different occasions that show various phenotypes show the dynamic metapopulation of the species and their constantly changing nature in the different body parts of examined patients in this narrow geographical area (one clinic of the city) [similarly to Odds et al. (2006;2007) for *C. albicans* from many geographic areas].

Visualization of phenotypic features of *C. albicans*

In order to visually represent and observe how *C. albicans* isolates may cluster according to nine investigated phenotypic properties, we generated a heat map (**Figure 2.**), and an additional dendrogram using normalized measured data for the phenotypic properties. The 63 *C. albicans* isolates are clustered to three main clades, however clusterization according to origins of the isolates is not observable. All of the clusters contained different isolates with different anatomical origins (body parts) and genotypes, and in one cluster there isolates from one patient may be present (patients 40; 41; 42; 43) or we could find isolates from one patient in distinct clusters (patients 21; 22; 23; 24; 39). Based on these previously mentioned observations, we could show the occurrences of the *C. albicans* isolates with different and diverse phenotypic properties (**Figure 2.**).

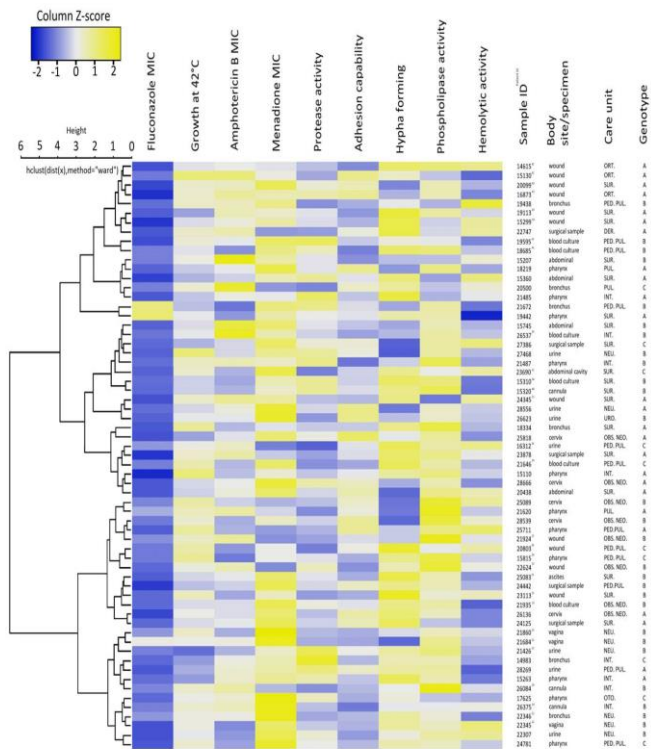


Figure 2.: Heatmap.

Visualization of the phenotypic features, showing the isolate numbers, the patient identifier in the upper index, the origins of the isolates (body parts or anatomical location), clinical care unit of isolation and ABC genotypes

Discussion of the investigations of phenotypic features and virulence factors of *S. cerevisiae* clinical isolates

The statistical analysis for *S. cerevisiae* clinical isolates was not possible because of the low sample numbers. In the absence of this, we made the following statements based on our measurements:

- 1.) In the case of this low sample number we can not draw a clear conclusion, but the clinical *S. cerevisiae* isolates are diverse in their phenotypical features according to our results.
- 2.) Some of their virulence factors are highly similar to the properties of the provenly opportunistic pathogen *C. albicans*.

11. Summary and Theses

In our study, we collected 63 clinical *C. albicans* isolates from the University Clinics of Debrecen and 12 clinical *S. cerevisiae* isolates from the University Clinics of Debrecen and Szeged and we investigated their phenotypic features. These isolates originated from patients of different age and gender, diagnosed with various underlying diseases. The *C. albicans* isolates were screened for nine different phenotypic features and virulence factors: hyphal growth, adhesion to plastic surface, hydrolytic enzyme productions, hemolytic activity, growth at high temperature, susceptibility to two antifungal and one oxidative stress agents and the ABC genotypes. The *S. cerevisiae* isolates were tested in my work for their hydrolytic enzyme productions, their hemolytic activity, their growth at high temperature and for their tolerance of two antifungal and one oxidative stress agents. Following the aforementioned experiments, we performed a statistical analysis for *C. albicans* isolates.

List of novel scientific results:

1. *C. albicans* phenotypic features more often show correlations with the patient-independent factors (the year and month of the isolation), than with patient-dependent properties (anatomical source of the isolates, patient age and sex, patients' underlying disease and disease severity, clinical care unit of isolation and ABC genotypes). Generally these isolates do not colonize certain organs or body parts with greater chance.
2. The different phenotypic features of the fungi did not show any significant relationships with each other, the values obtained for measurements on the yeasts' given phenotypic features and virulence factors did not correlate.

3. ABC genotypes of *C. albicans* do not show anatomical specialization and their occurrence is only correlated with a few patient-dependent factors. Different genotypes showed significant correlations with only a few phenotypic features (e.g. phospholipase activity, AmB tolerance).
4. The values of investigated phenotypic features of *S. cerevisiae* isolates are variable, indicating their relatively dynamic and diverse populations in the human body.

During our experiments, even after obtaining additional isolates from the University Clinics of Szeged, too few *S. cerevisiae* isolates were collected, therefore their data was not suitable for performing statistical analysis. On the other hand, their results were published by us in a geno- and phenotypic comparative study of clinical and commercial food/probiotic strain pairs. In this study investigating the clinical and non-clinical *S. cerevisiae* strains and isolates, we found that food- and probiotic-derived strains go through microevolutionary changes after the colonization of the hosts, and their geno- and phenotypic features are subjected to adaptive pressures. The examined clinical *S. cerevisiae* isolates could be traced back to food and probiotic ancestors based on their genetic features. Based on our results we concluded that the commercial *S. cerevisiae* fungi go through microevolutionary changes that in some cases result in commensalist adaptations.

Our novel approach outlined in my work can contribute to a comprehensive study of opportunistic pathogenic fungi, or fungi that might be evolving into potential pathogens. In the future, it would be worth to compare the different features of isolates from distinct cities, even other countries or continents and to observe their diversity in a wider geographical setting. In addition, with an evolutionary approach and focussing on niche specialization, it would be interesting to study which parameters and properties play important roles in the clustering of different isolates of these species.

Finally, due to the increasing occurrence of non-*albicans* species causing invasive fungal diseases, it is of high importance to study these fungi living in us as commensals, or becoming pathogens, from different aspects and with a deeper insight.

12. Acknowledgements

I would like to thank my supervisor, Prof. Dr. István Pócsi, head of DE-TTK Biotechnology and Microbiology Department, who made my doctoral work possible in his department and who shared his experience and supported my research with his useful advices.

I would like to express my thanks to my coauthor, Dr. Valter Péter Pfliegler for his conscientious work and selfless help and for sharing his expertise with me along this road.

I would like to thank Dr. László Majoros and Dr. Renátó Kovács (University of Debrecen, Institute of Medical Microbiology) for the *C. albicans* isolates with the necessary information and for their help in the investigation of antifungal susceptibility testing, as well as Dr. Edit Urbán (University of Szeged, Institute of Clinical Microbiology) for clinical *S. cerevisiae* isolates and thanks to Imre Zsuga, MSc student for help in the investigation if *S. cerevisiae* isolates, and to Judit Tóth, my BSc student who helped in the preliminary experiments for *C. albicans* isolates.

I am grateful to Prof. Dr. Zoltán Barta (University of Debrecen, Department of Evolutionary Zoology and Human Biology) who made the statistical analysis from the results of the investigated isolates and for his collaborative and helpful work.

I am also grateful to all the employees of the Department of Biotechnology and Microbiology, especially Dr. Ágnes Jakab for her help in the experiments, as well as to Erzsébet Vassné Orosz and for Anita Király and to our laboratory assistant Lászlóné Gábor Tóth, for making it possible to work in a pleasant environment, among friends.

Last but not least, I would like to say thanks to my husband and to the other members of my family and my friends for their constant inspiration and support.

13. Irodalomjegyzék/ References

- Anoop, V., Rotaru, S., Shwed, P. S., Tayabali, A. F., Arvanitakis, G. (2015). Review of current methods for characterizing virulence and pathogenicity potential of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains towards humans. *FEMS Yeast Research*, 15 (6).
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B.M., Walker, S.C. (2014). Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. *J Stat Softw*; 67(1):1–48.
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G., White, T. C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* 4: 165rv13.
- Chaves, G. M., Santos, F. P., Colombo, A. L. (2012). The persistence of multifocal colonisation by a single ABC genotype of *Candida albicans* may predict the transition from commensalism to infection. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107 (2), 198–204. <http://doi.org/S0074-02762012000200008> [pii]
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 3rd ed. M27-A3. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- De Llanos, R., Querol, A., Pemán, J., Gobernado, M., Fernández-Espinar, M. T. (2006). Food and probiotic strains from the *Saccharomyces cerevisiae* species as a possible origin of human systemic infections. *International Journal of Food Microbiology*, 110 (3), 286–290. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.023>
- Enache-Angoulvant, A., Hennequin, C. (2005). Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review. *Clinical Infectious Diseases*, 41 (11), 1559–1568.
- Fekete, A., Emri, T., Gyetvai, Á., Gazdag, Z., Pesti, M., Varga, Z.,

- Balla, J., Cserhádi, C., Emödy, L., Pócsi, I. (2007). Development of oxidative stress tolerance resulted in reduced ability to undergo morphologic transitions and decreased pathogenicity in a t-butylhydroperoxide-tolerant mutant of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, 7 (6), 834–847. <http://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00244.x>
- Fekete, A., Pócsi, I., Emri, T., Gyetvai, Á., Gazdag, Z., Pesti, M., Karányi Z., Majoros, L., Gergely, L., Pócsi, I. (2008). Physiological and morphological characterization of tert-butylhydroperoxide tolerant *Candida albicans* mutants. *Journal of Basic Microbiology*, 48 (6), 480–487. <http://doi.org/10.1002/jobm.200800114>
- Ghannoum, M. A., Jurevic, R. J., Mukherjee, P. K., Cui, F., Sikaroodi, M., Naqvi, A., Gillevet, P. M. (2010). Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathogens*, 6 (1), e1000713.
- Goldstein, A. L., McCusker, J. H. (2001). Development of *Saccharomyces cerevisiae* as a model pathogen: a system for the genetic identification of gene products required for survival in the mammalian host environment. *Genetics*, 159 (2), 499–513.
- Hanna, M., Xiao, W. (2006). Isolation of nucleic acids. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 313, 15–20. <http://doi.org/10.1385/1-59259-958-3:015>
- Höfs, S., Mogavero, S., Hube, B. (2016). Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *Journal of Microbiology*, 54 (3), 149–169. <http://doi.org/10.1007/s12275-016-5514-0>
- Hube, B. (2004). From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*, 7 (4), 336–341.
- Ibrahim, A. S., Mirbod, F., Filler, S. G., Banno, Y., Cole, G. T., Kitajima, Y., Edwards, J.E.Jr., Nozawa, Y., Ghannoum, M. A. (1995). Evidence implicating phospholipase as a virulence

- factor of *Candida albicans*. *Infection and immunity*, 63 (5), 1993-1998.
- Inci, M., Atalay, M. A., Koç, A. N., Yula, E., Evirgen, Ö., Durmaz, S., Demir, G. (2012). Investigating virulence factors of clinical *Candida* isolates in relation to atmospheric conditions and genotype. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 42 (SUPPL.2), 1476–1483. <http://doi.org/10.3906/sag-1204-119>
- Kantarcioğlu, A. S., Yücel, A. (2002). Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*, 45 (5- 6), 160-165.
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P.B., Christensen, R. H. B. (2015). lmerTest: Tests in Linear Mixed Effects Models. *R package version 2.0-29*.
- Luo, G., Samaranayake, L. P., Yau, J. Y. Y. (2001). *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (8), 2971–2974. <http://doi.org/10.1128/JCM.39.8.2971-2974.2001>
- Mayer, F. L., Wilson, D., Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4 (2), 119-128.
- McCullough, M. J., Clemons, K. V, David, A., Stevens, D. A. (1999). Molecular and Phenotypic Characterization of Genotypic *Candida albicans* Subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (2), 417–421.
- McGovern, P. E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R. A., Nunez, A., Butrym, E. D., Richards, M. P., Wang, C. S., Cheng, G., Zhao, Z., Wang, C. (2004). Fermented beverages of pre-and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (51), 17593-17598.
- Moyad, M. A. (2007). Brewer's/baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and preventive medicine: part I. *Urologic Nursing*, 27 (6), 560.

- Odds, F. C., Davidson, A. D., Jacobsen, M. D., Tavanti, A., Whyte, J. A., Kibbler, C. C., Ellis, D.H., Maiden, M. C., Shaw, D. J., Bain, J. M., Gow, N. A. (2006). *Candida albicans* strain maintenance, replacement, and microvariation demonstrated by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (10), 3647-3658.
- Odds, F. C., Bounoux, M. E., Shaw, D. J., Bain, J. M., Davidson, A. D., Diogo, D., Jacobsen M.D., Lecomte M., Li, S.Y., Tavanti, A., Maiden, M. C., Gow, N.A., d'Enfert, C. (2007). Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 6 (6), 1041-1052.
- Price, M. F., Wilkinson, I. D., Gentry, L. O. (1982). Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20 (1), 7–14.
- Ramage, G., Walle, K. V., Wickes, B. L., López-Ribot, J. L. (2001). Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (9), 3234–3240. <http://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3234>.
- Sardi, J. C. O., Duque, C., Höfling, J. F., Gonçalves, R. B. (2012). Genetic and phenotypic evaluation of *Candida albicans* strains isolated from subgingival biofilm of diabetic patients with chronic periodontitis. *Medical Mycology*, 50 (5), 467–75. <http://doi.org/10.3109/13693786.2011.633233>
- Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., Giannini, M. M. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62 (1), 10-24.
- Smith, D., Metzgar, D., Wills, C., Fierer, J. (2002). Fatal *Saccharomyces cerevisiae* aortic graft infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (7), 2691-2692.
- Strope, P. K., Skelly, D. A., Kozmin, S. G., Mahadevan, G., Stone, E. A., Magwene, P. M., Dietrich, F.S., McCusker, J. H. (2015). The 100-genomes strains, an *S. cerevisiae* resource that

- illuminates its natural phenotypic and genotypic variation and emergence as an opportunistic pathogen. *Genome Research*, 25 (5), 762-774.
- Takakura, S., Ichiyama, S., Bain, J. M., Davidson, A. D., Jacobsen, M. D., Shaw, D. J., Gow, N.A., Odds, F. C. (2008). Comparison of *Candida albicans* strain types among isolates from three countries. *International Journal of Medical Microbiology*, 298 (7-8), 663–668. <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.11.002>
- Tavanti, A., Davidson, A. D., Fordyce, M. J., Gow, N. A. R., Maiden, M. C. J., Odds, F. C. (2005). Population structure and properties of *Candida albicans*, as determined by Multilocus Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (11), 5601–5613. <http://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5601>
- Yáñez, A., Murciano, C., Llopis, S., Fernández-Espinar, T., Gil, M. L., Gozalbo, D. (2009). In vivo and in vitro studies on virulence and host responses to *Saccharomyces cerevisiae* clinical and non-clinical isolates. *Open Mycol J*, 3, 37-47.



Nyilvántartási szám: DEENK/80/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kreith-Boros Enikő
Neptun kód: I365I4
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10057452

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. Boros, E., Pfliegler, V. P., Kovács, R. L., Jakab, Á., Majoros, L., Barta, Z., Pócsi, I.: Candida albicans isolates from a single hospital show low phenotypical specialization.
J. Basic Microbiol. 57 (11), 910-921, 2017. ISSN: 0233-111X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201700037>
IF: 1.438 (2016)
2. Pfliegler, V. P., Boros, E., Pázmándi, K. L., Jakab, Á., Zsuga, I., Kovács, R. L., Urbán, E., Antunovics, Z., Bácsi, A., Sipiczki, M., Majoros, L., Pócsi, I.: Commercial strain-derived clinical *Saccharomyces cerevisiae* can evolve new phenotypes without higher pathogenicity.
Mol. Nutr. Food Res. 61 (11), 1601099-1 - 1601099-8, 2017. ISSN: 1613-4125.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201601099>
IF: 4.323 (2016)





További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (1)

3. Márkus, B., Szabó, K., Pfliegler, V. P., Petrényi, K., Boros, E., Pócsi, I., Tózsér, J., Csósz, É., Dombrádi, V.: Proteomic analysis of protein phosphatase Z1 from *Candida albicans*. PLoS One. 12 (8), e0183176-1 - e0183176-21, 2017. EISSN: 1932-6203.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0183176>
IF: 2.806 (2016)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,567

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
5,761

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.03.27.





Registry number:

DEENK/80/2018.PL

Subject:

PhD Publikációs Lista

Candidate: Enikő Kreith-Boros

Neptun ID: I365I4

Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences

MTMT ID: 10057452

List of publications related to the dissertation

Foreign language scientific articles in international journals (2)

1. Boros, E., Pfliegler, V. P., Kovács, R. L., Jakab, Á., Majoros, L., Barta, Z., Pócsi, I.: Candida albicans isolates from a single hospital show low phenotypical specialization.
J. Basic Microbiol. 57 (11), 910-921, 2017. ISSN: 0233-111X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201700037>
IF: 1.438 (2016)
2. Pfliegler, V. P., Boros, E., Pázmándi, K. L., Jakab, Á., Zsuga, I., Kovács, R. L., Urbán, E., Antunovics, Z., Bácsi, A., Sipiczki, M., Majoros, L., Pócsi, I.: Commercial strain-derived clinical Saccharomyces cerevisiae can evolve new phenotypes without higher pathogenicity.
Mol. Nutr. Food Res. 61 (11), 1601099-1 - 1601099-8, 2017. ISSN: 1613-4125.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201601099>
IF: 4.323 (2016)





List of other publications

Foreign language scientific articles in international journals (1)

3. Márkus, B., Szabó, K., Pfliegler, V. P., Petrényi, K., Boros, E., Pócsi, I., Tőzsér, J., Csósz, É., Dombrádi, V.: Proteomic analysis of protein phosphatase Z1 from *Candida albicans*. PLoS One. 12 (8), e0183176-1 - e0183176-21, 2017. EISSN: 1932-6203.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0183176>
IF: 2.806 (2016)

Total IF of journals (all publications): 8,567

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 5,761

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of Web of Science, Scopus and Journal Citation Report (Impact Factor) databases.

27 March, 2018



Az értekezés témakörében elhangzott előadások vagy poszterek/ Presentations or posters related to the topic of dissertation:

Boros E., Pócsi, I. (2014) A *Candida albicans* növekedésének, hifázókéességének és antimikotikumokkal szembeni érzékenységének meghatározása. *Hatvani István Szakkolégium 2014. évi Tavaszi Tudományos Hallgatói Konferencia*, Debrecen

Boros E., Pócsi, I. (2014) *Candida albicans* klinikai izolátumok élettani tulajdonságainak, virulencia faktorainak, antifungális és oxidatív szerekkel szembeni érzékenységének vizsgálata. *Hatvani István Szakkolégium 2014. évi Őszi Tudományos Hallgatói Konferencia*, Debrecen

Boros E., Pfliegler W. P., Kovács, R., Jakab, Á., Majoros, L., Barta, Z., Emri, T., Pócsi, I. (2017) *Candida albicans* izolátumok egy magyar klinikán: Dinamikus és diverz közösség.” *Candida albicans* isolates from a single Hungarian clinic: a diverse and dynamic community”. *VI. Magyar Mikológiai Konferencia*, Szeged

Egyéb, nem az értekezés témakörében készült poszter/ Other poster, not related to the dissertation:

Márkus, B., Szabó, K., Pfliegler, W. P., Petrényi, K., **Boros, E.**, Pócsi, I., Tőzsér, J., Csősz, É., Dombrádi, V. (2017). Proteomic analysis of protein phosphatase Z1 from *Candida albicans*. *EMBO Conference on Europhosphatases*, Párizs, Franciaország.