

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Paholcsek Melinda**

**PCR alapú aszpergillózis diagnosztikai módszerek  
fejlesztése és validálása**

**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS SEJT-ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2015**

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**PCR alapú aszpergillózis diagnosztikai módszerek  
fejlesztése és validálása**

**Paholcsek Melinda**

**Témavezető: Prof. Dr. Biró Sándor**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS SEJT-ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2015**

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	<b>5</b>
<b>2. BEVEZETÉS</b> .....	<b>6</b>
<b>3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	<b>9</b>
3.1 Az <i>Aspergillus</i> nemzetség .....	9
3.2 Az <i>Aspergillusok</i> életciklusa .....	10
3.3 Tudomány- és vallástörténeti vonatkozások .....	11
3.4 Alapvető védelmi mechanizmusok <i>Aspergillusok</i> által okozott fertőzések eliminálására .....	11
3.5 <i>Aspergillus</i> fajok által okozott megbetegedések .....	15
3.6 Rizikócsoport .....	16
3.7 Az invazív aszpergillózis megbetegedések epidemiológiája .....	17
3.8 A túlélés esélyei és a terápiás opciók .....	18
3.9 Az invazív aszpergillózis laboratóriumi diagnózisa .....	21
3.9.1 Szerodiagnózis .....	24
3.9.2 DNS alapú detektálás valós idejű rendszerben .....	26
3.9.3 Olvadáspon analízis .....	29
3.9.4 Fals pozitív eredmények .....	30
3.10 EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) .....	31
3.11 Kockázatelemzésre szolgáló, háromfokozatú kategóriarendszer .....	31
3.12 Diagnosztikai torzítás .....	32
3.13 Intézményi infekciókontroll .....	32
3.14 ISHAM-EAPCRI .....	33
<b>4. CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	<b>34</b>
<b>5. ANYAGOK és MÓDSZEREK</b> .....	<b>35</b>
5.1 <i>C-factor</i> homológok keresése BLAST programmal .....	35
5.2 Taqman® rendszerek .....	36
5.2.1 Taqman®-MGB esszék .....	37
5.2.2 Taqman®-LNA esszék .....	39
5.3 Mono-, ill. dual-copy Taqman® esszék fejlesztése .....	41
5.3.1 Genomi DNS kinyeréséhez használt fonalas gombák tenyésztésének körülményei .....	42
5.3.2 Genomi DNS izolálás fonalas gombákból .....	42
5.3.3 Genomi ekvivalens és kolóniaképező egységek .....	42
5.3.4 PCR amplifikációs kontrollok .....	43
5.3.5 Reakció pozitívítás és minta pozitívítás .....	44
5.4 Taqman® esszék dinamikus tartományának és analitikai specificitásának mérése .....	45
5.4.1 Taqman® esszék dinamikus tartományának mérése gDNS paneleken .....	46
5.4.2 Taqman® esszék analitikai specificitásának mérése gDNS paneleken .....	48
5.5 Olvadáspon analízis <i>Aspergillus fumigatus</i> és <i>Aspergillus lentulus</i> fajok azonosítására .....	49
5.5.1 <i>Aspergillus fumigatus</i> és <i>Aspergillus lentulus</i> HRM esszé dinamikus tartományának mérése gDNS paneleken ..	52
5.6 Taqman® esszék dinamikus tartományának mérése <i>Aspergillus</i> konídium tartalmú biológiai paneleken .....	53
5.6.1 Extrakciós és amplifikációs kontrollok .....	53
5.6.2 Konídium tartalmú biológiai panelek .....	53
5.6.3 Mechanikai lízis Roche MagNA Lyser berendezéssel .....	56
5.6.4 Nukleinsav izolálás Roche MagNA Pure LC 2.0 nukleinsav izoláló berendezéssel .....	56
5.6.5 Poszt-elúció .....	56
5.7 A 2014-es ISHAM-EAPCRI BAL panelek .....	57

<b>6. BETEGEK és MÓDSZEREK .....</b>	<b>60</b>
6.1 Betegpopuláció.....	60
6.2 Eset csoport, kontroll csoport.....	61
6.3 Az invazív tüdő aszpergillózis diagnosztikai stratégiája .....	61
6.3.1 Képkötő vizsgálatok .....	61
6.3.2 Biológiai marker-monitorozás .....	61
6.3.3 BAL analízis.....	64
6.3.4 Posztmortem hisztológia.....	64
6.4 Invazív tüdő aszpergillózis terápiás stratégiája .....	65
<b>7. ADATELEMZÉS .....</b>	<b>66</b>
7.1 Fontosabb statisztikai mutatók definiálása .....	66
7.2 Statisztikai vizsgáló módszerek.....	67
7.2.1 ROC analízis.....	68
7.2.2 Diagnosztikai vizsgáló módszerek összehasonlítása Kappa-teszttel .....	69
<b>8. EREDMÉNYEK.....</b>	<b>70</b>
8.1 <i>FacC</i> ortológ gének jelenlétét igazoltuk aszpergillóziót okozó humánpatogén fajokban .....	70
8.2 Taqman®-MGB és Taqman®-LNA esszék dinamikus tartománya gDNS paneleken .....	71
8.3 Taqman®-MGB esszék analitikai specifitása gDNS paneleken.....	74
8.4 Taqman®-LNA esszék analitikai specifitása a 2013-as ISHAM-EAPCRI paneleken .....	75
8.5 HRM esszé dinamikus tartománya <i>Aspergillus fumigatus</i> és <i>Aspergillus lentulus</i> gDNS paneleken.....	77
8.6 Aszpergillózis detektáló Taqman® esszék dinamikus tartománya konídium tartalmú biológiai mintákon.....	81
8.7 Taqman®LNA3 és Taqman®LNA4 esszék dinamikus tartománya nagyszámú szérumból mintán.....	82
8.8 Invazív tüdőaszpergillózis (ITA) infekciókontrollja .....	84
8.8.1 Esetcsoport, kontrollcsoport .....	84
8.8.2 Empirikus antifungális terápia .....	84
8.8.3 Konvencionális módszerek invazív tüdőaszpergillózis detektálására .....	85
8.8.4 Biológiai marker monitorozások eredményei .....	86
8.8.5 Kombinált biológiai marker-monitorozások eredményei.....	90
8.8.6 Túlélési ráták .....	93
8.9 Három esettanulmány.....	94
8.10 Diszkriminátorok diagnosztikai hatékonyságának alakulása az autopszia eredmények ismeretében .....	96
<b>9. NEMZETKÖZI SZEREP.....</b>	<b>97</b>
9.1 ISHAM-EAPCRI tagság .....	97
9.2 ISHAM-EAPCRI 2014-es BAL panel vizsgálatának eredményei.....	97
<b>10. MEGBESZÉLÉS.....</b>	<b>103</b>
<b>11. SUMMARY .....</b>	<b>114</b>
<b>12. ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>114</b>
<b>13. IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>116</b>
<b>14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>129</b>
<b>15. FÜGGELÉK.....</b>	<b>130</b>
Függelék 1.....	130
Függelék 2.....	131
<b>16. TÁRGYSZAVAK.....</b>	<b>132</b>
<b>17. KEYWORDS .....</b>	<b>133</b>

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>AIDS</b>	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> : szerzett immunhiányos tünetegyüttes
<b>ALL</b>	<i>Acute Lymphoblastic Leucemia</i> : Akut Limfoblasztos Leukémia
<b>AML</b>	<i>Acute Myeloid Leukemia</i> : Akut mieloid leukémia
<b>AUC</b>	<i>Area Under the Curve</i> : görbe alatti terület
<b>BAL</b>	<i>Bronchoalveolar Lavage</i> : bronchoalveoláris lavázs
<b>BDG</b>	<i>(1,3)-<math>\beta</math>-D-glucan</i> : (1,3)- $\beta$ -D-glükán
<b>CFU</b>	<i>Colony Forming Unit</i> : kolónia-képező egység
<b>Cp</b>	<i>Crossing point</i> : áttörési pont
<b>CT</b>	<i>Computed Tomography</i> : komputer tomográfia
<b>DC</b>	<i>Dendritic cells</i> : dendritikus sejtek
<b>DOR</b>	<i>Diagnostic odds ratio</i> : diagnosztikai esélyhányados
<b>EAPCRI</b>	<i>European Aspergillus PCR Initiative</i>
<b>EBMT</b>	<i>European Society for Blood and Marrow Transplantation</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> : enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálatok
<b>EM</b>	Egyéb malignitások
<b>EORTC</b>	<i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i>
<b>facC</b>	C faktor fehérje génje
<b>FAM</b>	6-carboxyfluorescein
<b>FRET</b>	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> : Förster-féle rezonancia energia átadás
<b>gDNS</b>	<i>genomic DNA</i> : genomi DNS
<b>GE</b>	<i>Genomic Equivalent</i> : genomi ekvivalens
<b>GM-EIA</b>	<i>Galactomannan enzyme immunoassay</i> : Galaktomannán enzim immunoesszé
<b>GMS</b>	<i>Grocott's methanamine silver stain</i> : Grocott-Gömöri féle methenamine ezüstfestés
<b>HL</b>	<i>Hodgkin lymphoma</i> : Hodgkin Limfóma
<b>HRM</b>	<i>High resolution melting</i> : nagyfelbontású olvadásgörbe analízis
<b>IDSA</b>	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
<b>ISHAM</b>	<i>International Society for Human and Animal Mycology</i>
<b>IA</b>	<i>Invasive aspergillosis</i> : invazív aszpergillózis
<b>ITA</b>	Invazív tüdőaszpergillózis
<b>ITS</b>	<i>Internal transcribed spacer</i> : rRNS géneket összekötő DNS szakaszok
<b>LNA</b>	<i>Locked nucleic acid</i>
<b>LNE</b>	Lázás neutropéniás epizód
<b>LoD</b>	<i>Limit of detection</i> : detektáció határértéke
<b>LR</b>	<i>Likelihood ratio</i> : valószínűségi hányados
<b>MGB</b>	<i>Minor groove binder</i>
<b>MM</b>	<i>Myeloma multiplex</i> : Mielóma multiplex
<b>MSG</b>	<i>Mycoses Study Group</i>
<b>NHL</b>	<i>Non-Hodgkin lymphoma</i> : Non-Hodgkin limfóma
<b>OD</b>	<i>Optical density</i> : optikai denzitás
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen Associated Molecular Patter</i> : patogénekre jellemző molekuláris mintázat
<b>PAS</b>	<i>Periodic acid-Schiff staining</i> : perjódsavas-Schiff festés
<b>PCR-IC</b>	PCR inhibíciós kontroll
<b>PCR-NTC</b>	PCR non-templát kontroll
<b>PRR</b>	<i>Pathogen recognition receptor</i> : patogén felismerő receptor
<b>PV</b>	<i>Predictive value</i> : prediktív érték
<b>PTCL</b>	<i>Peripheral T-cell lymphoma</i> : Perifériás T-sejtes Limfóma
<b>ROIs</b>	<i>Reactive oxygen intermediates</i> : reaktív oxigén gyökök
<b>ROC</b>	<i>Receiver operating characteristic</i>
<b>Se</b>	<i>Sensitivity</i> : Szenzitivitás
<b>Sp</b>	<i>Specificity</i> : Specificitás
<b>Tm</b>	<i>Melting point</i> : DNS molekulák olvadás pontja

## 2. BEVEZETÉS

Az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó gombákkal környezetünkben bárhol találkozhatunk, azonban opportunista patogénként csak legyengült immunrendszerű egyéneket képesek megbetegíteni. A veszélyeztetett csoportba az AIDS-esek, szolid tumoros vagy malignus vérképzőszervi megbetegedésekben (onkohematológiai) szenvedők, szerv- és csontvelő transzplantáltak, ill. a kemoterápiás kezelés alatt állók tartoznak.

A *Candida* fajok mellett az *Aspergillus*-ok felelősek a leggyakoribb nozokomiális gombás megbetegedések előidézéséért. A daganatellenes terápia során kialakuló lázas neutropénia 15%-al növeli a halálozást (Lyman és mtsai, 2010). Prevalenciájuk fokozatosan növekedő tendenciát mutat. Ennek a jelenségnek a magyarázata az elmúlt bő negyed évszázad szemléletváltozásában keresendő.

Az antibiotikum kúrákkal elért sikereknek köszönhetően, amelyek jelentősen mérsékeltek a különböző, nozokomiális infekciók okozta halálozásokat, egyre szélesebb körben alkalmazták a tartós immunszuppressziót kiváltó agresszív citotoxikus szereket szerv-, ill. csontvelő (hematopoetikus őssejt) transzplantációk, kemoterápiás kezelések, illetve autoimmun betegségek alkalmával. Ennek következtében aggasztó növekedés volt megfigyelhető egyes invazív gombainfekciók számában (Pagano és mtsai, 2001).

A kórok előidézéséért az esetek 90%-ában az *Ascomycota* törzsbe tartozó eukarióta, *Aspergillus fumigatus* fonalas gomba a felelős. Az elmúlt években azonban jelentős mértékben emelkedett az *Aspergillus terreus* által okozott megbetegedések gyakorisága is (Baddley és mtsai, 2003; Denning, 2006). A szervezetbe jutott konidiospórák megtelepedésétől függően a mikózis számos formáját ismerjük. A krónikus forma az idő előrehaladtával megfelelő kezelés hiányában és a fertőző ágens vérrendszer közvetített szétterjedése révén generalizálódik, a mikózis szisztémássá válik.

Annak ellenére, hogy már jó ideje jelentős előrelépésről számolnak be egyes elsővonalbeli antimikotikumok (pl. *Posaconazole* és a mind orálisan, mind pedig intravénásan is adható triazol, a *Voriconazol*) alkalmazásáról (Siwek és mtsai, 2006; Marco és mtsai, 1998), az invazív mikózisok napjainkban továbbra is a fejlett országok legmagasabb morbiditású és mortalitású betegségei közé tartoznak.

Szakirodalmi adatok az invazív mikózisban szenvedők számát közel kétmillióra becsülik, és mára már közel annyi ember haláláért felelnek, mint a malária vagy a tuberkulózis (Brown és mtsai, 2012). A csüggesztő statisztikai mutatók többek között a megfelelő érzékenységű és specificitású infektológiai tesztek, ill. a betegség korai szakaszában megkezdett antifungális terápia hiányával magyarázhatóak. Megfelelő antiinfektív terápia nélkül pedig a betegeknek esélyük sincs a túlélésre.

A mortalitási arány akár 100% (Denning, 2006) is lehet. Bizonyított tény továbbá, hogy minden antifungális kezelés nélkül eltelt óra további 8%-al növeli a mortalitást (Kumar és mtsai, 2006), így az antibakteriális terápia analógiájára megszületett az empirikus antifungális kezelés. Lévén, hogy a gombainfekciók okozta morbiditás jelentősen befolyásolja az onkohematológiai osztályokon kezelt betegek életkilátásait és életminőségét, egyre nagyobb jelentőségre tesz szert a kórházi infekciókontroll (Sinkó, 2011), melynek hatékonysága jelentős mértékben függ a kellően szenzitív és specifikus, költséghatékony molekuláris tesztektől.

A *Streptomyces*ek az *Actinomycetes* osztály *Actinomycetales* rendjének Gram-pozitív, apatogén, szaprofita baktériumai, amelyek a talaj természetes populációjának akár a 20%-át is alkotják. A már említett humánpatogén *Aspergillus* fajokkal közös ökológiai élőhelyeken osztoznak. Mióta kiderült, hogy számos fontos, szekunder metabolit termelésére képesek, jelentőségük megnőtt. A gyógyászatban használt bioaktív anyagok kb. 55%-át termelik (Champness, 2000).

Jelentős klinikai hasznuk mellett egyéb érdekes jellemvonásuk, mint fonalas szerveződésük, bonyolult morfológiai differenciálódásuk, DNS-ük 75% körüli G+C aránya, valamint kiugróan nagy genomméretük (8-11 Mb) egyaránt szerepet játszanak abban, hogy a legtöbbet tanulmányozott baktériumok közé tartoznak.

Növekedésük során olyan komplex morfológiai és biokémiai differenciálódási folyamatokon mennek keresztül, melyek sajátosságai szilárd és folyékony táptalajon jelentős eltéréseket mutatnak. Összetett életciklusuk szabályozásának lényeges komponensei a pleiotróp hatású autoregulátorok.

Az egyetlen, eddig ismert fehérje típusú autoregulátort, a C faktor fehérjét a DOTE Biológiai Intézetében (ma DE-ÁOK Humán-genetikai Tanszék) sikerült elsőként a termelő *Streptomyces griseus* 45H - az új taxonómiai besorolás szerint *S. albidoflavus* 45H - (Kiss és mtsai, 2008) törzsének 72 órás tenyésztéséből izolálni, azonosítani, génjét klónozni, szekvenálni, és szabályzó hatását vizsgálni (Bíró és mtsai, 1980; Birkó és mtsai, 1999). Szilárd táptalajon szerepet játszik a légmicélium képzésben, valamint befolyásolja a sporuláció folyamatát, míg folyékony táptalajon preconidium képzést indukál.

A génszakasz kódoló régiója GTG startkodontól TGA stopkodonig terjed, 972 bp nagyságú. A szekrécióna került fehérje 324 aminosavból áll. Az érett C faktor fehérje aminosav szekvenciáját PSI-BLAST homológia-kereső programokkal vizsgálva hozzá nagyon hasonló ortológ, azaz más fajokban meglévő, vélhetően hasonló funkciójú és közös evolúciós eredettel rendelkező géneket találtunk négy humánpatogén fonális gombafajban (lásd alább), további két apatogén gombában (*Podospora anserina* és *Penicillium chrysogenum* Wisconsin), egyéb más *Streptomyces* fajokban; *Streptomyces scabies*, *Streptomyces bingchengensis*, *Streptomyces ambofaciens* és *Streptomyces erythreus* (amely törzs újabb taxonómiai besorolása *Saccharopolyspora erythraea*), ill. néhány Gram-pozitív, nem *Actinomyces*, alacsony G+C tartalmú baktériumban (*Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Bacillus subtilis* és *Listeria monocytogenes*), valamint ezek fágjaiban.

A patogén fonális gombák közül az *Aspergillus fumigatus* és a *Neosartorya fischeri* valamint az *Aspergillus terreus* és a *Chaetomium globosum* fajokban található meg a gén. Ráadásul az *Aspergillus fumigatus* és a *Neosartorya fischeri* esetében a C-faktor génje egyszerre kettő, a hármas és az ötös kromoszómájukon is megtalálható. A két fajban a génekre nézve az 5-ös kromoszóma esetén 94,8%-os, míg a 3-as kromoszómák esetén 93,3%-os a hasonlóság. Időközben tudomásunkra jutott, hogy a még nem szekvenált *Aspergillus lentulus* genom is tartalmaz legalább egy, feltételezésünk szerint ugyancsak *facC* ortológ gént.

Mivel az adatbázis adatok alapján, a *facC* gén ortológjainak megléte főként olyan eukarióta, humánpatogén gombafajok esetében bizonyított, melyek az aszpergillózisos megbetegedések elsődleges kiváltóiként ismertek, ill. azon fajok genomjában nincsenek jelen, amelyek az immungyenge egyének szervezetében megtelepedvén szisztémás fertőzéseket (gombás, és bakteriális) okoznak, ezért kézenfekvő lehetőség kínálkozott olyan, invazív aszpergillózist detektáló nukleinsav esszék fejlesztésére, amelyek a C faktor fehérje ortológ génjeit használják (*facC*) targetként.

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1 Az *Aspergillus* nemzetség

Az *Aspergillus spp.* a legnagyobb gombacsoport, melyet a valódi gombák országába és az *Ascomycota* törzsbe tartozó fonalas szerveződésű fajok alkotják. A szeptumokkal tagolt, micéliumot fejlesztő fonalas gombákat termőtest felépítésük alapján az *Eurotiales* rendbe soroljuk, melyekre a kleisztotéciumos termőtest a jellemző.

Taxonómiai besorolásukat az 1. táblázat szemlélteti.

1. táblázat. *Aspergillusok* taxonómiai besorlása.

Ország	<i>Fungi</i>
Törzs	<i>Ascomycota</i>
Osztály	<i>Euascmycetes</i>
Rend	<i>Eurotiales</i>
Család	<i>Trichocomaceae</i>
Nemzetség	<i>Aspergillus</i>
Főbb, reprezentatív fajok	<i>Aspergillus fumigatus, Aspergillus terreus, Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Aspergillus nidulans</i>

Közéjük tartozik az összes ismert gomba 30%-a, de az imperfekt alakokkal együtt arányuk akár a 75 %-ot is elérheti (Denning, 2006). A kozmopolita, “Janus arcú” nemzetség tagjai sok egyéb mellett metabolikus diverzitásuknak köszönhetően (pl. számos különböző szénforráson is egyaránt képesek nőni és szaporodni) jelentősek az ökológiai bioremediációban, mezőgazdaságban, a gyógyszer- és élelmiszeriparban, továbbá jelentős a szerepük mind az állat, ill. a humán közegészségügy területén (Varga és Samson, 2008; Samson és mtsai, 2004). Annak ellenére, hogy kártételüknél lényegesen jelentősebb a gazdasági hasznuk, rettegett nemzetségként ismertek. Akad köztük számos, az élő szervezetekre káros hatású növény (*Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus*), állat- és humánpatogén faj is (*Aspergillus fumigatus, Aspergillus terreus, Aspergillus lentulus, Aspergillus flavus, Aspergillus niger*).

Nem csoda tehát, hogy az *Aspergillus* gombafajok a mikológiai, az ipari biotechnológiai, mikrobiológiai, molekuláris biológiai, genetikai és orvosbiológiai kutatások egyik legintenzívebben vizsgált nemzetsége, hiszen megismerésük gyakorlati szempontból fontos, ám mivel több modellszervezet is akad köztük, elméleti szempontból is kimagasló jelentőségű.

Az *Aspergillus nidulans* sejtbológiai és genetikai aspektusból is az egyik legmélyrehatóbban tanulmányozott modell szervezet. Biodegradációs jelentőségük óriási. Fontos szerepük van a biológiai szén- és nitrogén körforgásban. Számos fajuk jól ismert enzimtermelő képességéről, melyek közül sokuknak igen jelentős és széleskörű a gazdasági hasznuk a fermentációs (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus soyae*) iparban (Bennett 1985; Bennett 2001). Ilyen pl., a koji fermentáció, amit évezredekkel ezelőtt még kizárólag, tapasztalati alapon fejlesztettek. Igen jelentős továbbá bizonyos fajok szerves sav, mint az oxál-, ill. citromsav (*Aspergillus niger*) termelő képessége. Ismertek továbbá egyes élő szervezetekre káros, pl. antibiotikum-, mikotoxin- (pl. az *Aspergillus flavus* által termelt aflatoxin) míg másokra jótékony (pl. a koleszterincsökkentő ágensként ismert sztatinok) hatású szekunder metabolit termelő képességükről. Az *Aspergillus terreus* volt az első modell organizmus, amelynek tanulmányozásával felderítették a lovasztatin bioszintetikus útvonalat (Hendrickson és mtsai, 1999).

### 3.2 Az *Aspergillusok* élelciklusa

Teljes élelciklusú, dimorf fajok. Életük során ivaros és ivartalan szakaszok váltogatják egymást. Mindkét forma képes önmagát fenntartó, sokszorosító képletek létrehozására. Ivartalan, vegetatív szaporodásuk során az utódok genetikai értelemben pontos másai, klónjai a szülőtörzsnek, kivéve a paraszexuális folyamatok során ritka eseményként bekövetkező mitotikus vagy szomatikus rekombináció eredményét.

Az ivaros, azaz a szexuális szaporodás lényege az, hogy a két szülőtörzs ivarsejtjeinek egyesülésével létrejött utódsejt (diploid zigóta) mindkét szülő genetikai állományát hordozza. Az ivaros ciklus kritériuma, hogy benne sejt- és sejtmagfúzió, ill. meiózis követik egymást, tehát a cikluson belül a haploid és diploid magfázis váltakozik. A szexuális szaporodást (ivarsejtek egyesülése) és a vegetatív sejtek egyesülését (anasztomózis) kompatibilitási rendszerek szabályozzák.

### 3.3 Tudomány- és vallástörténeti vonatkozások

Tudománytörténetük több ponton összefonódik mind direkt, mind pedig átvitt értelemben a vallással. Számos, ma már jól ismert gombás megbetegedésre találhatók utalások a héber Bibliában (*Leviták könyve*, 13-14. fejezetek).

Az *Aspergillus* nemzetséget 1729-ben, egy olasz botanikus, *Pietro Antonio Micheli* (1679-1737) nevezte el. Fő műve, a *Nova Genera Plantarum* 1729-ben került kiadásra, melyben az autodidakta botanikus 900 gombafajt ír le. Az *Aspergillus* genus a római katolikusok által a nagymiséken használt szenteltvíztartóról kapta a nevét, amelyre a tudóst a mikroszkópikus méretű spóratartó struktúrák emlékeztették.

A német származású *Heinrich Anton DeBary* (1831-1888) - akit sokan a modern mikológia- ill. fitopatológia atyjaként is ismernek - 1850-es évekbeli munkássága a penészgombák, különösképpen az *Aspergillus*-ok taxonómiájában mérföldkőnek számított. Ő volt továbbá az első, aki felfigyelt arra a jelenségre, hogy a nemzetség számos tagjának egyaránt van ivartalan (anamorf/imperfect/mitospórás) és ivaros (teleomorf/perfekt/meiospórás) szaporodási ciklusa, amely az autodidakta mikológus számára megnehezíti a binominális nevezéktan helyes használatát és értelmezését ([Bennett 1985](#)).

### 3.4 Alapvető védelmi mechanizmusok *Aspergillusok* által okozott fertőzések eliminálására

A nagy mennyiségű, aeroszolikus spórákat termelő *Aspergillusok* az immunrendszer sejtjeinek

- **távol tartására:** a konidiospórák *RodAp* és *RodBp* gének által kódolt hidrofób karakterű fehérjékből álló rodlet-rétegüknek köszönhetően jól ellenállnak a degradációnak, ill. annak melanin pigmentáltsága melynek szerepe van a fagociták távol tartásában,
- **eliminálására:** patogénitási faktorok (pl. a gliotoxin immuntoxin, amelynek fontos szerepe van a makrofágok reaktív oxigéngyök termelésének gátlásában is) számos praktikat, ill.
- **védelmi mechanizmusok** széles tárházát: különféle exoenzimek termelése pl. szuperoxid dizmutáz, kataláz (fontos szerepe van a reaktív H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eliminálásában) foszfolipáz, alkalikus proteáz, stb. fejlesztették ki ([Jahn és mtsai, 2000](#); [Paris és mtsai, 2003](#); [Youngchim és mtsai, 2004](#); [Syed és mtsai, 2012](#); [Sales-Campos és mtsai, 2013](#)).

A levegőben terjedő, rendkívül kicsi méretű (2-5 µm) spórák belégzésüket követően először az orrüreg, orrmelléküreg, légcső és a hörgők felszínét borító **csillószőrös hengerhámsejtekkel** és a légutakat borító **mukózával** érintkeznek, amelyek ún. **anatómiai barrier**ként szolgálnak a gombák elleni védekezésben (Margalit és Kavanagh, 2015). Csillós mozgásukkal kisöprik (mukociliáris öntisztítás) a gomba aeroszolok jelentős részét (Garlanda és mtsai, 2002), ám azon konídiumok, amelyek mégis bejutnak az alveólusokba a veleszületett immunrendszer sejtjes elemeivel, az alveoláris **fagocitákkal (monociták, makrofágok, neutrofil granulociták és dendritikus sejtek)** lépnek kapcsolatba (Latge, 1999; Medzhitov, 2007; Brown, 2011).

- A **monociták** a fertőzés kezdeti szakaszában az antigénnel való találkozás hatására **makrofágokká** differenciálódnak. A makrofágok fő funkciói közé tartozik a patogén konidiospórák, ill. hifák bekebelezése és fagocitózis útján történő eliminálása, biológiailag aktív molekulák előállítása (citokinek, kollektinek, lipid mediátorok), amelyek más fagocitáknak a fertőzés helyére történő toborzását végzik, ill. antigén prezentálás a limfociták számára (Zelante és mtsai, 2007/a).
- **Neutrofil granulociták.** Proteolitikus enzimeket (**szerin proteázok** úgy, mint **elasztáz, katepszin-g, proteináz-3**) termelnek és tárolnak granulumaikban (Tkalcevic és mtsai, 2000). A sikeres patogének elleni védekezés nagy mennyiségű reaktív oxigéngyök (reactive oxygen intermediates; ROI) képzést indukál, amelyet a NADPH oxidáz enzim katalizál. Gyorsan, nagy mennyiségű ROI-t (**szuperoxid, hidrogén peroxid, hidroxil gyökök**) képesek előállítani. Ez az ún. **“respiratory burst”**, amely lényegében a patogének degradációját, illetve a környező epithelium roncsolódását eredményezi (Babor és mtsai, 1973, Schaffner és mtsai, 1982). A **melanin bioszintézis** összefüggésben áll a ROI-kkal szemben mutatott érzékenységgel, ui. kimutatható, hogy minél kevésbé pigmentált a konídium, annál erősebb szenzitivitást mutat az oxidatív stressz iránt (Jahn és mtsai, 1997; Jahn és mtsai, 2002). A neutrofil sejtek aktivációjuk során „degranulálódnak”, azaz azok tartalmát az extracelluláris térbe választják ki.
- A **dendritikus sejtek (DC)** a külső és belső környezet közt kapcsolatot fenntartó epitheliális barriereknél tárolódnak nagyobb mennyiségben, amelyek az esetek többségében a patogének szervezetbe jutásának kapuiként szolgálnak (Garlanda és mtsai, 2002). Fontos szerepük van a **natív es az adaptív immunrendszer közti kommunikáció** fenntartásában.

A gombasejtek falában levő  $\beta$ -1,3-glukán, amelyet a csírázó gombák nagy mennyiségben választanak ki a környező szövetekbe is, a **dectin-1 ligandja** (Bellocchio és mtsai, 2004/a, Luther és mtsai, 2007). A DC-k aktivációjukat követően a legközelebbi nyirokcsomókba vándorolnak, ahol a B-és T-sejtekkel való kapcsolatba lépést követően **adaptív immunválaszt generálnak** az általuk termelt immunmoduláló citokinek hatására.

Az alveólusokba jutott konidiospórák egy részét az **alveoláris makrofágok** bekebelezik (Latge, 2001; Brown, 2011), ám vastagon pigmentált burkuknak és a hidrofób fehérjékből álló rodlet-rétegüknek köszönhetően nem azonnal, hanem csak a csírázásukat követően indul meg a neutrofil sejtek offenzívája (Jahn és mtsai, 2000, Latge, 2001). A fertőzés helyére vonzott **neutrofil granulociták** az általuk termelt citokinek (IL-10, IL-12, TNF $\alpha$ ) hatására nagy hatékonysággal eliminálják a kórokozók jelentős részét, gyulladási folyamatokat és a környező szövetek roncsolódását indukálva. A neutropeniás betegek azért is vannak kiteve jelentős mértékben a betegség veszélyének, mert az imént bemutatott fehérvérsejteknek rendkívüli a jelentősége az alveólusokba jutott spórák és hifák hatékony eliminálásában.

A patogének antigéneivel legelőször találkozó fagocita sejtek **antigén prezentáló funkciót** (antigen presenting cells, APC) is betöltenek. Az APC-k a fagolizoszómáikban lebontott patogéneket a megfelelő antigént kötő, T-sejt receptorral (T-cell receptor, TCR) rendelkező CD4+ segítő (T-helper; Th) limfocitáknak mutatják be, amelyek az epitópokat csak akkor képesek felismerni, ha azok úgynevezett fő hisztokompatibilitási génkomplex (MHC II) által kódolt membránfehérjékhez kapcsolódnak (Ramadan és mtsai, 2005, Reis e Sousa, 2006, Zelante és mtsai, 2007/b).

Az APC-k az *Aspergillus*-ok felszínén olyan molekuláris mintázatokat ismernek fel, amelyek a gazdaszervezet saját sejtjeire nem jellemzőek. Ezen molekulák alkotják a **patogénnel asszociált molekula mintázatot** (PAMP). Ilyenek lehetnek a gomba sejtek falában levő különböző **glukánok, kitin, galaktomannán** (GM), stb (Latge, 2001). A PAMP-ok felismerésére képes receptorok az úgynevezett **mintázat felismerő receptorok** (PRR) (Medzhitov, 2007). Ez utóbbiak evolúciósan konzerváltak (Beauvis és Latge, 2001). A csírávonalon kódolt PRR-ok a patogének felismerése szempontjából ugyan korlátozott repertoárral rendelkeznek, ennek ellenére a patogének széles spektrumát felismerik (Medzhitov és Janeway, 2000).

A gomba patogéneknek az immunsejtek PRR-aihoz való kötődése számos fontos immunfolyamatot indukál (fagocitózis, „respiratory burst”, citokin termelés (Medzhitov, 2007)). A gombák felismerésére alkalmas PRR-ok kétféle formában fordulhatnak elő. Egyesek sejtmembrán asszociáltak, (direkt felismerés), míg mások oldott, **szolúbilis** formában (indirekt felismerés) vannak jelen a vérben és opszoninok által kötődnek a PAMP-hoz.

- **Toll-szerű receptorok** (TLR-ek). Kifejeződhetnek epithel sejtek, DC-k, makrofágok, T-sejt, B-sejt külső felületén és az intracelluláris organelleikben is egyaránt. A **TLR-2** receptor számára mind a gomba konídium, ill. a hifa, míg a **TLR-4** csak a konídiumok bizonyos szénhidrát komponensei szolgálhatnak ligand gyanánt (Bellocchio és mtsai, 2004/b).
- **C-típusú lektin receptorok** elsősorban DC-ken találhatóak. A **dectin-1** és a **DC-SIGN** transzmembrán receptorok közvetlenül ismerik fel az *Aspergillus*-okat a konídiumok falában található a  $\beta$ -1,3 glukán (dectin-1) és a galactomannán a (DC-SIGN) ligandoknak köszönhetően (Serrano-Gomez és mtsai, 2004; Serrano-Gomez és mtsai, 2005).
- **Kollektinek (szolúbilis, C-típusú lektinek):** A májsejtek által szekretált **mannóz kötő lektinnek** (MBL) fontos szerepe van a patogének opszonizációjában, ill. a komplement komponensek (C4b, C3b) mozgósításában (Neth és mtsai, 2000; Thiel, 2007). A bronchusok epithel sejtjei által termelt és az alveoláris térbe szekretált **surfactant SP-A** és **SP-D** nem aktiválják komplementrendszer, viszont opszonizálják a patogéneket azáltal, hogy a gombák  $\beta$ -1,6-glukán molekuláihoz kötődnek, előidézvén azok makrofágok és neutrofilek által történő eliminálását (Allen és mtsai, 2001; Che és mtsai, 2012).
- **Pentraxinok (szolúbilis receptorok): C-reaktív protein** (CRP) és a **pentraxin-3** (PTX3). A CRP a májsejtek szekretálják, a klasszikus komplement útvonalat aktiválja (Szalai, 2002). A PTX3-at szekretálják a DC-k, fibroblasztok, endothél, epithel sejtek, de a neutrofilek granulumaiban is termelődik (Garlanda és mtsai, 2005). Csak a konidiospórákat ismerik fel, hifákat nem (Garlanda és mtsai, 2002). Szerepük van a patogének opszonizálásában, alveoláris makrofágokat vonzanak és a gombák fagocitózisát indukálják (Garlanda és mtsai, 2006).

A szervezetbe jutó konidiospórák eliminációjában elsősorban a veleszületett (natív) immunrendszer elemeinek van fontos szerepe, ám működésük szorosan és funkcionálisan összefonódik a szerzett (adaptív) immunrendszer sejtjeivel (Hohl és Feldmesser, 2007). A natív immunrendszer elemeinek patogének általi aktivációja egyúttal az **effektor funkciók közvetlen beindítását** is jelenti (Walsh és mtsa, 2005), hiszen olyan mediátorok (kemokinek, citokinek) képződését indukálják, amelyek hatására a T-limfociták differenciálódnak proinflammatorikus Th1, ill. Th17 sejtekké, vagy anti-inflammatorikus Th2 sejtekké, melyek összehangolt működésének fontos szerepe van a gyulladásos folyamatok, ill. a nem kívánt szöveti roncsolódás közti egyensúly fenntartásában (túlzott Th2 sejtválasz megnövelheti a gombafertőzések iránti fogékonyságot) (Brown és mtsai, 2012).

### 3.5 *Aspergillus* fajok által okozott megbetegedések

Az *Aspergillus*ok ritkán okoznak egészséges emberekben megbetegedéseket, és a fertőzés sem szokott emberről emberre terjedni. Az ubiquiter fajok széleskörű adaptációs képességének köszönhetően a levegőben szabadon szálló, konidiospórák gyakorlatilag bárhol fellelhetőek. Talajban, vízben, romló táplálékokon, rothadó szerves maradványokon, légkondicionáló berendezésekben, számítógép ventilátorokban, de párnákban, takarókban egyaránt előfordulnak. Az *Aspergillus* nemzetség tagjai opportunistá patogének, így annak ellenére, hogy az egészséges immunrendszerű egyének naponta akár több száz spórát is belélegezhetnek (Chazalet és mtsai, 1998), ők nem veszélyeztetettek, azonban az immundeficiens, vagy legyengült immunrendszerű egyéneket képesek megbetegíteni.

Az *Aspergillus* fajok által előidézett tüdőmegbetegedéseket annak megfelelően írják le, hogy a szervezetbe jutott konídiumok a légzőszervrendszer mely részén képesek megtelepedni (kolonizálni). Kolonizációs képességüket jelentősen befolyásolja az immunrendszer aktuális állapota.

Az *aszpergilloma* a gombák megtapadását követően alakul ki, és gombafonalakat, nyákot, fibrint, vérváladékot és fehérvérsejteket tartalmaz. A góc fokozatosan nő, és pusztítja a környező szöveteket. Nem jelent komoly veszélyt az egészségre, de nem is maradhat kezelés nélkül. Az *invazív tüdőaszpergillózis* (ITA) az esetek 90%-ára jellemző. Súlyos, immungyenge állapotban jön létre.

Az immundefektusból adódóan idővel (hónapok, sokszor akár évek leforgása alatt) generalizálódhat a fertőzés, és a gomba angioinvázióját követően a vérrendszer révén disszeminálhat akár a vesébe, májba, központi idegrendszerbe (Vidal és mtsai, 2005; Hummel és mtsai, 2006) stb. Az idő előrehaladtával a korlátozott vagy teljes immuninkompetencia következtében az invazív fertőzések szisztémássá válnak és annak ellenére, hogy az alapbetegség állapotában általános javulás mutatkozik, a másodlagosan kialakuló fertőzések halálhoz vezethetnek. Az **allergiás bronchopulmonáris aszpergillózis** egy hiperszenzitív tüdőbetegség, amelyet az *Aspergillus* antigének váltanak ki. Allergiás tüneteket produkáló túlérzékenységi reakció.

### 3.6 Rizikócsoport

Az invazív aszpergillózisos betegségek tradicionálisan (az első megfigyelések a 1970-es évekből származnak) összefüggésbe hozhatóak olyan megbetegedésekkel, amelyek esetében a neutrofilek számának kóros lecsökkenése áll (Meyer és mtsai, 1973), amelyekről *in vitro* tesztelések során beigazolódott, hogy képesek az *Aspergillus* hifa fonalakat eliminálni (Diamond és mtsai, 1978).

A rizikócsoportba immundeficiens betegek, elsősorban kóros, hematológias (neutrophil sejtek száma  $<500 \times 10^6/\text{liter}$ ) megbetegedésekben szenvedők; akut-, krónikus limfoid leukémiás, Hodgkin nem Hodgkin típusú limfómás, mielóma multiplexes betegek (Montagna és mtsai, 2012; Bergeron és mtsai, 2012), ill. szerv (Pacholzyk és mtsai, 2011), őssejt- vagy csontvelő transzplantáltak tartoznak (Patterson és mtsai, 2009; Lortholary és mtsai, 2011). Az 1990-es években Denning és Stevens arról számoltak be, hogy az invazív aszpergillózis (IA) incidenciája őssejttranszplantált betegekben akár 94%-ot is elérheti (Denning és Stevens, 1990). Ezen kívül rizikófaktort jelentenek a hosszan elnyúló antibiotikum kúrák, a rossz táplálkozási szokások, munkahelyi ártalmak, valamint a szervtranszplantáltak esetén alkalmazott immunszuppresszálo ágensek, mint a kortikoszteroidok és a ciklosporin használata (Florent és mtsai, 2006; Pagano és mtsai, 2006).

A légutak közvetítésével vagy esetleges műtéti beavatkozások révén szervezetbe jutott opportunistá patogének kolonizálható felületet találnak, képesek megtelepedni, s invazív, szisztémás megbetegedéseket előidézni. Mindenképp említést érdemelnek a nem primer hematológias megbetegedésekre visszavezethető AIDS-es esetek is.

### 3.7 Az invazív aszpergillózisos megbetegedések epidemiológiája

*“The mold, *Aspergillus fumigatus*, is a cause of spontaneous infections in man, domestic mammals, and both domestic and wild birds. In man and the mammals such infections are so rare as to be of little practical importance”.*

*/Arthur T. Henrichi, 1938/*

1938-ban *Arthur T. Henrichi* az IA fő okozó ágensét, az *Aspergillus fumigatus* spontán és enyhe lefolyású betegségek okozójaként írta le. A II. világháborút követően fokozatosan növekvő tendencia volt megfigyelhető az invazív mikózisok esetek számában, spektrumában olyannyira, hogy mára már a fejlett országokban az invazív gombás megbetegedések rendelkeznek az egyik legmagasabb morbiditási, ill. mortalitási<sup>1</sup> statisztikai mutatóval.

Az elmúlt bő negyed évszázadban az invazív aszpergillózisok esetek számában közel négyszeres, a mortalitásukban pedig 57%-os növekedés mutatkozott és az immungyenge betegpopulációban az invazív aszpergillózist közel 90%-os mortalitási rátájával nem olyan régen még a széles spektrumú antimikotikumok (flukonazol, vorikonazol) piacra bocsátásának ellenére is vezető halálokként tartották számon ([McNeil és mtsai, 2001](#)).

Az *Aspergillus fumigatus* közegészségügyi szempontból az egyik leggyakoribb és egyben a legveszélyesebb, levegőben terjedő humánpatogén ([Denning, 1998](#)).

Kórházi statisztikák szerint az európai populációban az összes halálozások 7%-áért az *Aspergillus fumigatus* tartják felelősnek ([Denning, 2006](#)).

Ugyan az invazív aszpergillózisban szenvedő betegek klinikai izolátumának 90%-ában az *Aspergillus fumigatus* valamely törzsét azonosítják, azonban az *Aspergillus terreus*-nak is egyre növekszik a jelentősége ([Lass-Flörl és mtsai, 2005](#); [Mokaddas és mtsai, 2010](#)). Ezen faj említésre méltó továbbá azért is, mert rezisztenciát mutat számos, elsővonalbeli antimikotikummal szemben (pl., *amphotericin-B*) ([Demitrovicova és mtsai, 2013](#)).

---

<sup>1</sup> A **morbiditási** és **mortalitási** ráták a betegségek, ill. halálokok gyakoriságának mérésére, összehasonlítására szolgálnak, továbbá értékeik mindig csak egy adott időszakra, ill. populáció méretre vonatkozhatnak.

### 3.8 A túlélés esélyei és a terápiás opciók

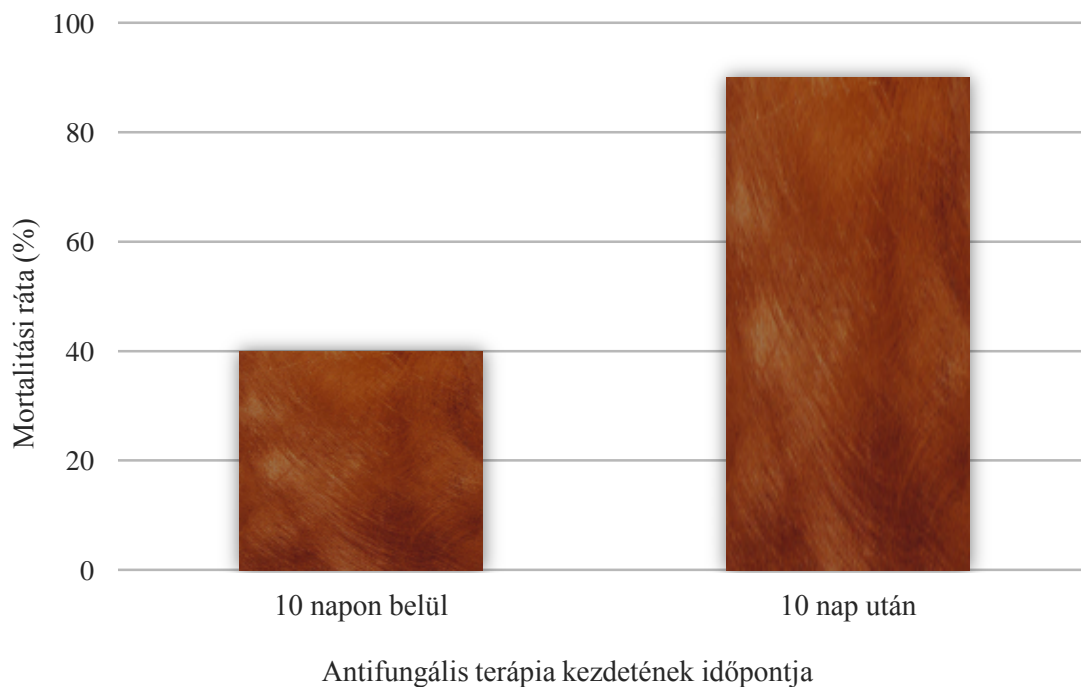
*“Az invazív aszpergillózisban szenvedő betegek átlagosan 30 nappal hosszabb ideig fekszenek kórházi osztályon azoknál, akik ilyen betegségben nem szenvednek, ebből adódóan ellátásuk költségei esetenként átlagosan 75 000 Euróval emelkednek. Az Amerikai Egyesült Államokban évente 10 000 új megbetegedésről számolnak be. Egy 1996-ban végzett felmérés adatai szerint, az Amerikai Egyesült Államokban az évi költségek elérték a közel 500 millió eurót”.*

*/Jürgen Löffler, 2007/*

A komplex, invazív beavatkozásoknak és a rezisztens fajok elterjedésének köszönhetően, az 1990-es évek óta gyakorlatilag megduplázódott az invazív mikózisos esetek száma, azonban a mortalitási ráták változását illetően, érdekes jelenségnek lehetünk tanúi. Annak ellenére, hogy Denning 10 éve még arra hívta fel a szakma figyelmét, hogy az aszpergillózisos esetek megfelelő kezelés hiányában akár 100%-a halálos kimenetelűek is lehetnek (Denning, 2006), addig egy három évvel későbbi tanulmány már csupán 35%-ra becsüli azon betegek arányát, akik a fertőzéstől számított 12 héten belül el is haláloznak (Neofytos, 2009).

Egy európai tanulmány különböző, hematológiai megbetegedésekben szenvedő, invazív aszpergillózisos eset 12 héten belül bekövetkező mortalitási rátáját már csak 42%-ra becsülte és további csökkenést mutatott erre vonatkozóan a nyomonkövetés hat éves (2004-2009) időszakában (Nicolle és mtsai, 2011). Ezzel szemben, egy másik tanulmány az akut mieloid leukémiás, invazív aszpergillózisos betegek túlélési esélyeire vonatkozóan romló statisztikai adatokról számolt be, mely szerint az a nyomonkövetés időszaka alatt 32%-ról 14%-ra csökkent (Michallet és mtsai, 2012). Akadnak további szerzők, akik magyarországi adatokra támaszkodva azt állítják, hogy akut leukémiában és limfómában szenvedő betegek esetében közel 50%, azaz igen magas a letalitás, míg a transzplantált betegek csoportjában súlyosabb prognózis volt tapasztalható, s a halálozási arány elérte a 87%-ot is (Sinkó, 2011).

Rendkívüli jelentőséggel bírna a megelőzés, amely a rizikócsoport betegeire nézve meghatározott időközönkénti, folyamatos mintavételezést és költséghatékony mintafeldolgozást követően, szenzitíven szűrnie a kórokozók jelenlétére. Indikáció esetén pedig az antimikotikumok pre-emptív alkalmazása képes lehetne a betegség prevalenciájának mérséklésére. Számolni kell azonban a rezisztens gombafajok megjelenésével (Barton, 2013).



**1. ábra. Korai, ill. kései antifungális terápia és a mortalitási ráta közötti összefüggés.**

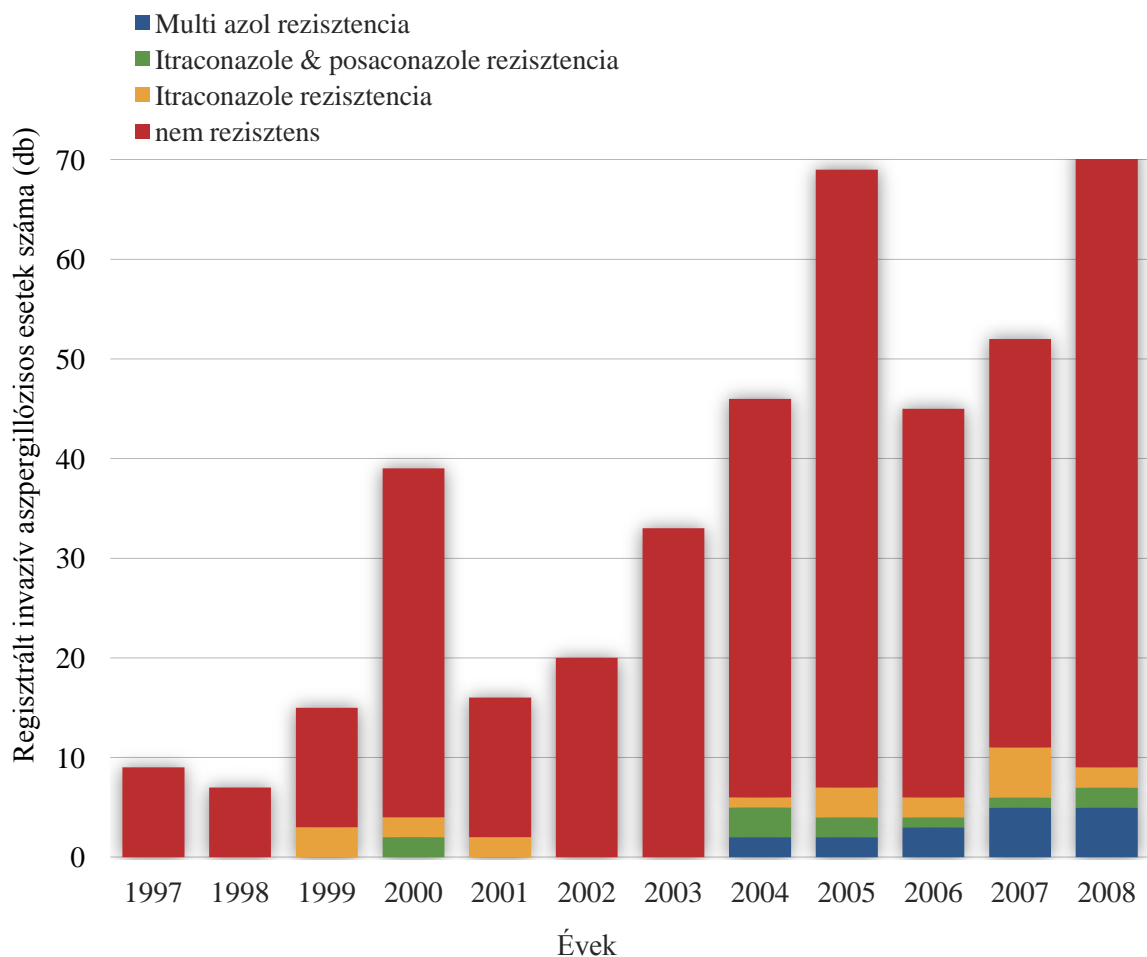
Attól függően, hogy az adekvát terápiát 10 napon belül, vagy csak ezt követően kezdik meg, drasztikus mértékben csökkennek 60%-ról 10%-ra a betegek túlélési esélyei (Von Eiff és mtsai, 1995).

A késői diagnózissal a betegek túlélési esélyei napról-napra drasztikus mértékben csökkennek (1. ábra), és ezzel arányosan emelkednek a terápiás költségek is. Bizonyított tény ugyanis, hogy az invazív aszpergillózisos betegek lényegesen hosszabb ideig szorulnak kórházi ellátásra, így lényegesen magasabbak kezelési költségeik is (Menzin és mtsai, 2009; Kim és mtsai, 2011). Az invazív aszpergillózisos esetek évenkénti kezelésére fordított gombaellenes terápia költségeit Európában több százmillió euróra becsülik. Ezen költségek mérséklése céljából elengedhetetlen jelentőséggel bírna az *Aspergillusok* species szintű detektálása, mely a célzott gombaellenes terápia előfeltétele, hiszen a különböző fajok eltérően reagálnak a különböző terapeutikumokra, nem beszélve arról, hogy ily módon kontrollálható és csökkenthető lenne a nagyszámú azol típusú antimikotikumokra rezisztens gombafajok folyamatos előretörése (Barton, 2013; Alcazar-Fuoli, 2008).

Az *Aspergillus terreus*ról például tudjuk, hogy természetéből adóan rezisztens az *amphotericin-B*-re (Gerhard és mtsai, 2013), amely az ezredfordulót megelőző antifungális érában az elsődlegesen választható opciók közt szerepelt, amikor is még az invazív aszpergillózisos betegek gyógyulási esélyei meglehetősen kedvezőtlenek voltak.

Az *amphotericin-B*-t az utóbbi időben előszeretettel kombinálják különböző triazol származékokkal, mint amilyen a *Voriconazole* (Segal és Walsh, 2006), amely valódi áttörést jelentett, jelentősen javítva a betegek túlélési esélyeit; 70,8% szemben a korábban, hagyományosan választandó *amphotericin-B*-hez képest; 52,8% (Sinkó, 2011).

Az *Aspergillus fumigatus* azollal szemben mutatott rezisztenciája az utóbbi évtizedekben egyre aggasztóbb mértéket ölt (2. ábra). A piacon folyamatosan jelennek meg újabb, hatékonyabb, egyre kevesebb mellékhatással járó antimikotikumok, azonban a szisztémás, invazív mikózisoktól szenvedő betegek esetében a gyógyszeres terápia mellett a környezet spóramentesítése ugyancsak kritikus. Ezt központi, nagy teljesítményű légszűrők, az elfekvő osztályokon pedig zsiliprendszer kialakításával érik el (Perdelli és mtsai, 2006).



**2. ábra. *Aspergillus fumigatus* fajok azol rezisztenciájának alakulása.**

A manchesteri központi mikológiai laboratórium 1997-2008 közt eltelt 12 éves időszakban, az *Aspergillus fumigatus* izolátumokon végzett vizsgálatait alapján megállapítható, hogy az azol rezisztens fajok megjelenésében egy dinamikus növekvő tendencia mutatkozik (Howard és mtsai, 2009).

### 3.9 Az invazív aszpergillózis laboratóriumi diagnózisa

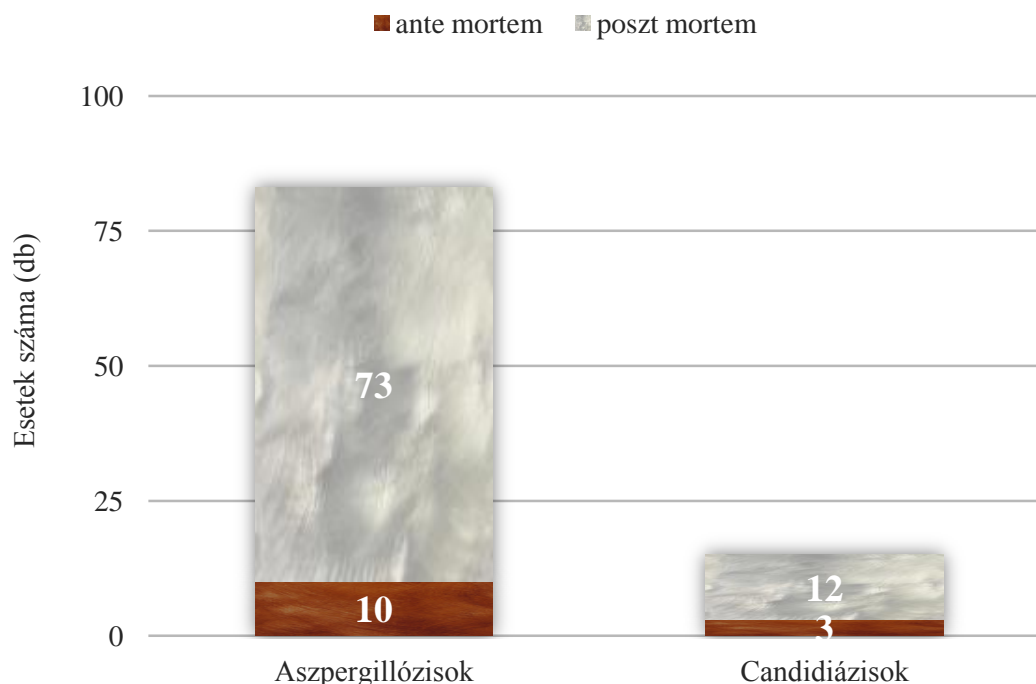
Az aszpergillózis diagnosztika módszerei lehetnek **konvencionálisak**, ill. **molekulárisak**, továbbá a mintavételezés, jellegéből adódóan lehet **invazív** valamint **noninvazív**. Jelen ismereteink szerint nem ismert még olyan noninvazív diagnosztikai eljárás, kereskedelmi forgalomban hozzáférhető infektológiai teszt, amely önmagában is képes rövid időn belül, megbízható eredményekkel szolgálni.

Megbízható diagnózis felállítása nehézkes, ugyanis:

- ❖ Az immunhiányos állapot hosszától, esetleg bizonyos, tartósan fennálló környezeti ártalmak jellegétől (munkahelyek, ahol az egészséges immunrendszerű betegek tartósan, az átlagosnál magasabb spóra expozíciónak vannak kitéve, pl. a szántóföldeken kaszáló emberek, a pékek) függően megállapítható, hogy az egyes páciens kohorszok a különböző terápiás opciók, ill. a túlélési esélyek tekintetében rendkívüli diverzitást mutatnak. Számos olyan eset ismert, amikor a hosszú évek során a tüdőben megtelepedett *Aspergillus* gomba kolóniák semmi komolyabb panaszt nem okoztak egészen addig, míg egy tartós immungyenge állapot nem állt be. A fertőzés reaktiválódását követően, a betegség lefolyása már extrém ütemben zajlik.
- ❖ A kórokozó ágensek egyéb más fajokkal való együttes előfordulásukból kifolyólag csak nehezen azonosíthatóak.
- ❖ Az invazív aszpergillózis tünetei egyáltalán nem specifikusak, sőt rendkívül változatosak. A tipikus gyulladási markerek, mint a *C-reaktív proteinek*, ill. a prokalcitonin, egyáltalán nem specifikusak az invazív aszpergillózisra ([Chai és Kontoyiannis, 2010](#)). Amint az aszpergillózisra gyanút adó tünetek először manifesztálódnak, az már a betegség kórtörténetében egy előrehaladott állapotnak felel meg. Megállapítható továbbá, annak ellenére, hogy az infekció kezdeti időszakában szinte egyáltalán nem, vagy csak alig mutatkoznak specifikus, aszpergillózisra gyanút adó tünetek, a betegség lefolyása rendkívül dinamikus.

A megtámadott szövetekben a gombák jelenléte kellő biztonsággal vagy csak az időigényes tenyésztéses (Groll és mtsai, 1996; Walsh és mtsai, 2008), vagy hisztopatológiai eljárásokkal, azaz a megfelelő helyről származó biológiai minták, biopsziás mintavételezések (bronchoalveoláris lavage mintavétel; BAL) gombatenyészteteinek elemzésével igazolható. Az említett módszereknek azonban számos hátránya ismert. Invazív beavatkozást igényelnek, amely figyelembe véve a betegek amúgy is rendkívül rossz fizikai állapotát (az onkohematológiai betegekben a fennálló vérzékenység miatt ellenjavallt a szöveti mintavételezés), a háttérbetegségeik kockázati tényezőit, csak nagyon indokolt esetben kivitelezhető.

Ezen túlmenően rendkívül körülményes és nehéz a klinikai rutin diagnosztikában biztosítani a feltételeket a steril mintavételezésekhez, és a köpetből, orrváladékból, BAL-ból stb. kitenyészthető fajok már gyakran csak a betegség előrehaladott voltát képesek jelezni (White és mtsai, 2006/b; Erjavec, Verweij 2002). Ilyen eljárásokra gyakran már csak poszt mortem kerül sor (Walsh és mtsai, 2008) (3. ábra).



**3. ábra. Aszpergillózisok és Candidiázisok ante mortem és poszt mortem megoszlása.**

Egy 2009-ben született retrospektív tanulmány *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Pneumocystis*, *Zygomycota* fajok okozta gombafertőzések megoszlását vizsgálta az 1984-2002-ig terjedő, 18 évet átfedő időszakban ante mortem és poszt mortem vizsgálatok eredményei alapján (Antimori és mtsai, 2009).

Számos, kereskedelmi forgalomban hozzáférhető, invazív beavatkozást nem igénylő aszpergillózis diagnosztikai módszer létezik, amelyek nagy előnye, hogy rövid időn belül képesek eredményeket szolgáltatni.

Feltalálását követően (Compton, 1991) az aszpergillózis diagnosztika ugyancsak alkalmazta a transzkripció mediált amplifikációs stratégiát, a NASBA-t (nucleic acid sequence-based amplification) (Loeffler és mtsai, 2001). Ez egy RNS alapú, azonos hőmérsékleti profilon végbemenő (nem igényel speciális PCR készüléket, csak inkubátort), izotermális (41°C) amplifikációs stratégia. Az alacsony hőmérsékleti profil nagy hátránya, hogy DMSO hozzáadása ellenére is magas az aspecifikus amplifikáció.

A fals-pozitívok viszonylag magas arányának, ill. a nem kívánt keresztreakcióknak köszönhetően, mára már alábbhagyni látszik a népszerűségük a DNS alapú és a szerológiai módszerek kombinációjával létrejött PCR-ELISA technológiáknak (Florent és mtsai, 2006; Denning; 2006; Williamson és mtsai, 2000). A hibrid eljárás előnye abban állt, hogy képes volt ötvözni a PCR reakciók erősségét képező magasfokú (94-100%) specificitást és a szerológiai módszerekre jellemző érzékenységet (85-100%) (Florent és mtsai, 2006; Aquino és mtsai, 2007).

Gomba infekcióra nem csak specifikus gomba antigének jelenlétéből következtethetünk, hanem adott diagnosztikai eljárás alapulhat *Aspergillus* antigének (D-arabinitol, mannitol, stb.) jelenlétére adott válaszreakció által termelt antitest (anti-arabinitol, anti-mannán, stb.) detektáláson is. Egyre elterjedtebbek a kilégzéses tesztek, amelyek segítségével *Aspergillus* kolóniák jelenlétét képesek kimutatni a tüdőben. A biológiai marker a 2PF (2-pentyl-furán). Ezen a téren mondhatni még gyerekcipőben jár a szakma, hiszen számos kérdés marad megválaszolatlan. Jelenleg még az sem egyértelműen eldöntött tény, hogy mi az elfogadott cut-off érték, amelyet meghaladva adott minta pozitívnak tekinthető. Számos étel esetében igazolták, hogy olyan "magas" 2PF szinttel rendelkeznek, hogy jelenlétük a szájban vagy a gasztrointesztinális traktusban kontaminációt, a biológiai minták fals-pozitivitását okozzák (Chambers és mtsai, 2011).

2008 óta Lateral-Flow Device (LFD) néven kereskedelmi forgalomban hozzáférhető egy immunkromatográfiás gyorseszteszt, amely képes a gomba infekció során nagy mennyiségben termelődött, szérumban oldott *Aspergillus* specifikus glikoprotein epitópok kimutatására egér immuoglobulin G (IgG) JF5-monoklonális antitesttel való detektálás révén (Thornton, 2008; White és mtsai 2013; Held és mtsai, 2013). Nagy előnye, hogy nem szükséges a biológiai mintákat az analízisükhöz megfelelően felszerelt referencia laboratóriumokba küldeni. Egy 2009-es tanulmányban tengerimalacokat fertőztek *Aspergillus*-sal és azt vizsgálták, hogy a megbetegedéstől számítva hány nap elteltével képesek az egyes immunesszék az okozó ágensek (*Aspergillus*-ok) kimutatására. Arra jutottak, hogy az LFD bizonyult a legeredményesebbnek az invazív aszpergillózis korai detektálására, hiszen az már az 5. nap elteltével képes volt kimutatni az invazív aszpergillózt az eset csoport 82%-ában. Ezzel szemben 5 nap után az *Aspergillus* GM-EIA (galaktomannán enzim immunoesszé) szenzitivitása csak 59% volt, a  $\beta$ -D-glükán teszt pedig csak az esetek 23%-ában volt képes aszpergillózt diagnosztizálni (Wiederhold és mtsai, 2009).

### 3.9.1 Szerodiagnózis

A szerológiai módszerek az időigényes tenyésztéses eljárásokkal szemben akár már három órán belül képesek eredményeket szolgáltatni (Aquino és mtsai, 2007). Mivel az élővilágban általánosan előforduló gombasejtfalalkotókra szűrnek, nagy hiányosságuk, hogy nem alkalmasak species szintű azonosításra, ezért a differenciál diagnózishoz kombinálni kell őket egyéb más, biomarker detektáláson alapuló módszerekkel.

A surrogate markerek<sup>2</sup> az esetek többségében általános gombasejtfal alkotók. A Pastorex *Aspergillus* latex agglutináció immunoesszé, valamint ennek továbbfejlesztett, érzékenyebb változata a Platelia *Aspergillus* szendvics-ELISA esetében olyan biológiai markerek jelenlétére szűrnek vérből vagy vizeletből (Verweij és mtsai, 1995), amelyek kibocsátása dinamikusan változik a betegség előrehaladtával.

---

<sup>2</sup> Surrogate marker: biológiai aktivitás mérésére szolgáló marker molekulák, amelyek mennyisége a terápia hatékonyságának függvényében változik, ezért alkalmazzák őket adott terápiás kezelés hatékonyságának elsődleges indikátoraiként.

A *Platelia Aspergillus* ELISA (Mennink-Kersten és mtsai, 2004) által detektált galaktomannán (GM) molekula (Stynen és mtsai, 1992), rendelkezik egy nem immunogén, ún. 'mannán core' központi magrésszel és több, immunoaktív,  $\beta$ -1-5 galaktofuranozil egységet (a GM kimutatására alkalmazott patkány monoklonális antitest EB-A2 ezen epitópokhoz kötődik) tartalmazó oldalláncokkal (Latge JP és mtsai, 1994, Quindos, 2006). A GM nem kizárólag az *Aspergillusok*-ban fordul elő. Megtalálható számos más gomba falában, mint pl. *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* és *Histoplasma* (Mikulska és mtsai, 2012).

A GM-hez hasonlóan ugyancsak fontos gombasejtfal alkotóként ismert az (1,3)- $\beta$ -D-glükán (BDG) molekula (1,5)- $\beta$ -galaktofuranozil oldallánca (Fungitell/GlucateLL esszé) (Miyazaki és mtsai, 1995), amely szintén megtalálható pl. a *Candida*, *Fusarium*, *Acremonium*, ill. a *Pneumocystis jiroveci* gombák falában (Hope és mtsai, 2005; Marty és mtsai, 2009). Nem hiába ismeri a szakma pánfungális markerként.

Mind a GM, mind pedig a BDG molekula jellemzője, hogy a fertőzés terminális szakaszában érik el a legmagasabb szérumszintet (Mennink-Kersten és mtsai, 2006; Morton és mtsai, 2010), de igazolták, hogy már a fertőzés korai fázisától (első hét) fogva kimutatható az antigének jelenléte.

Kezdetben úgy tartották, hogy a vizelet a leginkább ideális minta az invazív aszpergillózis GM szerodiagnózisára (Rogers és mtsai, 1990), azonban ez hamar megcáfolásra került (Stynen és mtsai 1992). Míg régebben inkább a teljes vér (Hebart és mtsai, 2000; Lass-Floerl és mtsai, 2004) vagy plazma (Kawazu és mtsai, 2004), addig manapság inkább a szérumszint (Florent és mtsai, 2006) ill. a BAL mintákat tekintik a szakma a legideálisabbnak a különféle ELISA-immunoesszék számára.

Annak ellenére, hogy az említett immunoesszék eredményei jelentős befolyással bírnak a klinikai döntéshozatalra, és így hatással vannak a betegeknek a gombainfekciókra vonatkozó, háromfokozatú EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) / MSG (Mycoses Study Group) kategóriarendszer valamelyikébe való besorolására (De Pauw és mtsai, 2008), szakirodalmi adatok alapján szenzitivitásuk meglepően széles tartományban mozgott (29-100%). Specificitásuk ennél lényegesen behatároltabb (81-98%) (Hope és mtsai, 2005).

Egy 2012-ben közölt, 13 éves időszak adatait feldolgozó meta-analízis szerint a  $\beta$ -D-glükán (BDG) teszt szenzitivitása 77%, míg specificitása 83% (Onishi és mtsai, 2012). Más meta-analízis adatok arról számolnak be, hogy a *Platelia Aspergillus* GM-EIA immunoesszé szenzitivitása 77% [95% CI, 61-89], specificitása 81% [95% CI, 72-88], míg a (1,3)- $\beta$ -D-glükán teszt szenzitivitása 78% [95% CI, 67-84], specificitása pedig 85% [95% CI, 79-89] (Karageorgopoulos és mtsai, 2011). Érdekes eredménnyel zárult továbbá egy 2008-ban közölt meta-analízis, amely az 1998-2006 közt eltelt időszak (9 év) során publikált 30 tanulmány eredményeit összegezte és ily módon kalkulálta a *Platelia Aspergillus* GM-immunosszé szenzitivitási 78% (61-89%) és specificitási 81% (72-88%) értékeit OD 0.5 cut-off értéknél (Leeflang és mtsai, 2008). Még frissebb tanulmányok szerint az *Aspergillus* GM-EIA specificitása (91,5%) ennél is jobbnak bizonyult (White és mtsai, 2013).

A kereskedelmi forgalomban jelenleg hozzáférhető, szerodiagnosztikai módszerek rövid jellemzését az 1. függelék-ben tüntettük fel.

### 3.9.2 DNS alapú detektálás valós idejű rendszerben

A megfelelően megtervezett PCR reakciók nemcsak az *Aspergillus*ok genus (18S rRNS gének), hanem akár a species szintű (ITS1-5.8S rRNS-ITS2) azonosítására is képesek (Erjavec, Verweij, 2002). Ez utóbbiakat többnyire a gombák variábilis és/vagy konzervált szakaszait egyaránt tartalmazó riboszómális DNS target komplexek (rDNS) - 5.8S (Varga és mtsai, 2000; Springer és mtsai, 2013), 18S (Loeffler és mtsai, 2001), 28S riboszómális RNS gének - vagy az őket összekötő ITS (internal transcribed spacer) (Hinrikson és mtsai, 2005; White és mtsai, 2010/a), vagy esetleg egyes gomba mitokondriális DNS szakaszaira (Bretagne és mtsai, 1995) tervezik, lehetőséget teremtve a szisztémás aszpergillózis szempontjából legjelentősebb okozó ágensek (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus versicolor*) által előidézett megbetegedések azonosítására (Einsele és mtsai, 1997).

A DNS detektáláson alapuló módszerek nemcsak species szintű diszkriminációra alkalmasak, de akár a fertőző ágensek egyes antifungális szerek ellen mutatott rezisztenciájának az azonosítására is (Perlin és Park, 2001; White és mtsai, 2015). A fajazonosítás történhet specifikus, szekvencia eltéréseken alapuló olvadási görbe analízisekkel, diagnosztikus szekvenálásokkal, vagy egyszerű, fajspecifikus primer-próba kombináción alapuló detektálással, akár multiplexeléssel.

A nukleinsav alapú módszerek könnyű kivitelezhetőségüknek, időtakarékoságuknak és jó reprodukálhatóságuknak köszönhetően rendkívül elterjedtek (White és mtsai, 2010/b). Megfelelően megválasztott célgéntől függően magasfokú specificitást (közel 100%) mutatnak (Aquino és mtsai, 2007). Elmondható, hogy e területen a diagnosztika megfelelően beállított és a jó specificitással rendelkező módszereknek köszönhetően az utóbbi időben jelentős előrelépést tett (Springer és mtsai, 2013). A valós idejű PCR rendszerek már alacsony templát koncentráció mellett is alkalmasak rendkívül pontos mennyiségi meghatározásra. Femtogram, azaz akár egyetlen kópia target szekvencia is kimutatható. A DNS amplikonok mennyiségi változásának valós idejű, azaz ciklusról ciklusra történő monitorozása képezi a kinetikus reakciók alapját.

Ha a biológiai mintákban gomba eredetű nukleinsavak találhatók, azok kevesebb, mint egy nap alatt kimutathatóak. Manapság a legelterjedtebb diagnosztikai módszerek közé azok tartoznak, melyek kivitelezése, valós idejű PCR rendszerben (Quantitatív Real-Time PCR) történik (Bolehovska és mtsai, 2006; White és mtsai, 2006/b; Cesaro és mtsai 2008), azaz alkalmas az amplifikáció ciklusról ciklusra történő nyomon követésére (Kang és mtsai, 2000).

Egyéb tényezők, mint a vizsgált minta eredete pl. teljes vér (White és mtsai, 2010/a), szérum (Springer és mtsai, 2013), BAL (Torelli és mtsai, 2011), a biológiai minta térfogata (Suarez és mtsai, 2008), DNS izolálás hatékonysága, a primerek szerkezete és specificitása (képeznek-e dimereket vagy egyéb, aspecifikus szaporulatokat) a PCR reakció típusa (sima, fészkel, valós idejű, asszimmetrikus), PCR inhibitorok jelenléte (citrát, heparin) ugyancsak jelentősen befolyásolják az érzékenységet.

A real-time rendszerű esszék rendkívüli specificitása azzal magyarázható, hogy a mért fluoreszcens szignál intenzitás változás követésének előfeltétele a primerek, ill. a próbá(k)nak target szekvenciá(k)hoz való egyidejű kötődése. Az "online monitoring"-nak köszönhetően, a futással szimultán végezhető az analízis. A reakciók kinetikája zárt rendszerben, folyamatosan nyomon követhető. A real-time rendszerek kevesebb, mint 2 logaritmusváltozást is képesek kimutatni, azonban alacsony kópiaszám mellett (kevesebb, mint 20 kópia/reakció cső) már számolnunk kell a bemérési hibákból és a részecskék eloszlásából következő "poisons error"<sup>3</sup>-al (Peccoud és Jacob, 1996).

A technika fejlődésével nemcsak a reakciók elvégzéséhez szükséges idő csökken, de a reakciók költségei is egyre kedvezőbben alakulnak, ezáltal a real-time rendszerű platformok mind szélesebb körben elérhetők.

A kereskedelmi forgalomban jelenleg hozzáférhető, nukleinsav alapú diagnosztikai módszerek rövid jellemzését az [1. függelék](#)-ben tüntettük fel.

---

<sup>3</sup> Poisons error = (Poisson-féle hiba) nagyon kis mennyiségű templát eloszlásából adódó, nem reprezentatív mintavételezés. Nagyon alacsony templát koncentráció mellett egymást követő bemérések nagy szórást mutatnak. Általánosságban elmondható, hogy minél alacsonyabb a templát koncentráció, annál nagyobb a poisons féle eloszlási hiba.

### 3.9.3 Olvadáspon analízis

Az olvadáspon analízis egy downstream-PCR alkalmazás, amely a target mennyiségi meghatározása mellett alkalmas a különböző amplikon molekulák szekvencia eltéréseinek detektálására, így fajazonosításra is. Eltérő szekvenciájú nukleinsav molekulák elsősorban G+C tartalmuktól és hosszuktól függően (befolyásolhatják még egyéb DNS-hez interkalálódó anyagok, mint a DMSO ill. sók, mint  $MgCl_2$  tartalom) más és más olvadásponnal rendelkeznek, ily módon fokozatos melegítés mellett pontosan meg tudjuk határozni az egyes amplikon elegyek  $T_m$  (olvadás) pontját<sup>4</sup>.

Szekvenciától független detektáláson alapuló analízis, amelynek során a használt festék (SYBRGreen, EvaGreen, ResolightDye) aspecifikusan kötődik minden dsDNS-hez, majd azt gerjesztvén, adott hullámhosszúságon fényt emittál, amit mérünk. Az ilyen jelölő anyagok használata abban az esetben javasolt csak, ha a primerek kellő specificitást nyújtanak, s nagyon kicsi az esélye aspecifikus melléktermékek keletkezésének. A módszer további előnye lehet, hogy a kapott tiszta amplikon oldat optimális esetben további célokra (pl. szekvenálás) közvetlenül felhasználható.

A célszekvencia felsokszorozódását követően lassan elkezdjük melegíteni az amplikon oldatot, miközben nyomon követjük az emittált fluoreszcencia változását. Olvadáspon analízis során azt a hőmérsékleti értéket határozzuk meg, amelynél a tiszta amplikon elegy 50%-a szimpla szálú, nem tiszta amplikon elegy esetén jól kivehetőek a keletkezett heteroduplex molekulák leolvadási pontjai is. A fluoreszcenciának a hőmérséklet függvényében való ábrázolása egy csökkenő szigmoid görbét eredményez, amelynek az inflexiós pontja adja meg az olvadásponot. A könnyebb értelmezhetőség kedvéért ezeket a kinetikai görbéket negatív derivált ( $-dF/dT$  a hőmérséklet függvényében) alakjukban ábrázoljuk, ahol az inflexiós pont(ok) egyértelmű csúcs(ok)ként jelöli(k) ki az olvadási hőmérsékletet. Minden amplikonhoz jellemző csúcs tartozik, így több csúcs több inflexiós pontot, így több eltérő amplikont jelez.

Sokkal pontosabb kiértékelést tesz lehetővé a nagy felbontású olvadásgörbe analízis (HRM analízis), amely során a fluoreszcencia intenzitást egy arra alkalmas szoftver pontról-pontra követi, majd a megrajzolt leolvadási görbéket egymásra vetíti.

---

<sup>4</sup> A DNS  $T_m$  pontja (melting temperature) az a hőmérséklet, amelynél az adott fragmentum halmaz 50%-a szimpla szálú formában van jelen.

### 3.9.4 Fals pozitív eredmények

A nem megfelelően kivitelezett, ám rendkívül szenzitív real-time PCR reakciók, az ubiquiter okozó ágensek jelenlétéből adódóan fals-pozitív eredményekhez és a specificitás romlásához vezethetnek. A nagy százalékban jelentkező fals-pozitív eredmények csak az imént taglalt módszerek (szerológiai valamint DNS alapú) megfelelő kombinációjával és a kapott eredmények többszöri reprodukálásával zárhatók csak ki. A real time rendszerben kivitelezett PCR-reakciók alkalmával pedig, esetenként még a nem aszpergillózisos epizódok esetében is nehezen elkerülhető, hogy a köpet-, valamint a különböző testfolyadékokból (bronchoalveoláris folyadék) származó biopsziás mintákba ne kerüljenek a helytelen mintavételezés során a környezetből, vagy az egészséges immunrendszer védekező mechanizmusai által degradált patogén gombák nukleinsav törmelékei (Bolehovska és mtsai, 2006).

Szerológiai módszerek esetén a hamis-pozitív eredmények kiugróan magas száma olyan betegcsoportok esetében tapasztalható, amelyeket közvetlenül a diagnózist megelőzően *Piperacillin-Tazobactam*, *Ampicillin-Sulbactam* valamint *Amoxicillin-Klavulánsav* béta-laktám típusú antibiotikumok és béta-laktamáz gátlók együttes kombinációjával valamint egyéb antibiotikumokkal, mint *PenicillinG*, *Ceftriaxon*, *Imipenem*, *Ciprofloxacin*, *Vancomicin*, *Gentamicin* stb. kezeltek (Aquino és mtsai, 2007). Ezen esetek kontaminációra vezethetők vissza, ami azzal magyarázható, hogy az antibiotikum kezelés alatt álló betegek esetén a kezeléseik során szennyezőanyagokat juttattak a véráramba (a béta-laktám típusú antibiotikumokat termelő *Acremonium* genusz sejtfalában szintén találhatóak galaktofuranozil oldalláncok) (Florent és mtsai, 2006).

### 3.10 EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer)

Az 1962-ben létrejött, “*Européen de Chimiothérapie Anticancéreuse (GECA)*” független csoport alapítója Prof. Henri Tagnon volt. A megalakulását követő hatodik évben, 1968-ban a szervezet a mai “*European Organisation for Research and Treatment of Cancer*” (EORTC) nevű, brüsszeli székhelyű, tudományos, multinacionális és multidiszciplináris, közel 30 ország 300, elsősorban rákkutatással foglalkozó centrumát egyesítő, ill. több mint 2500 kollaborációs partnert magában foglaló kutatói szervezetté alakult át. Az EORTC mára már egy főként belga, holland és francia, bár 1972 óta jelentős mértékű transzatlanti támogatással is bíró alapítvány, amelynek alapvető céljai közé tartozik az alapkutatások és a klinikai vizsgálatok közötti rés összehárására irányuló úgynevezett transzlációs kutatások<sup>5</sup> előmozdítása, továbbá a modern, hatékony és kevesebb nem kívánt mellékhatással járó kemoterápiás ágensek fejlesztése, tesztelése. A szervezet tagjainak alapvető célja nem más, mint a multi-központú, klinikai kísérletek koordinálása, klinikai, gyakorlati irányelvek létrehozása, gyógyszerhatástani, epidemiológiai, vizsgálatok előmozdítása és támogatása, továbbá az újonnan napvilágot látó innovatív módszerekkel a daganatos megbetegedések kezelésében folyamatosan javuló tendencia elősegítése.

### 3.11 Kockázatelemzésre szolgáló, háromfokozatú kategóriarendszer

Az invazív gombás megbetegedések utóbbi évtizedekben mutatott romló morbiditási, ill. mortalitási mutatóinak köszönhetően, az EORTC szervezet figyelmének a fókuszába kerültek. Megalakult az invazív mikózisokkal foglalkozó MSG konszenzus csoport; European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG). Felismerték ugyanis, hogy ahhoz, hogy eredményesen szállhassanak szembe az invazív mikózisokkal, mindenképp létre kell, hogy hozzanak egy kockázatbecslésre alkalmas modellt. Alapvető igény ugyanis, hogy a klinikusok képesek legyenek megbecsülni az invazív mikózisok valószínűségét (probability) és a lehetőségét (possibility), objektív, klinikai, radiológiai és mikrobiológiai vizsgálatokkal ahhoz, hogy a betegek egyértelműen besorolhatóak legyenek a három fő kategória (“proven” = bizonyított, “probable” = valószínű, “possible” = nem bizonyított) valamelyikébe.

---

<sup>5</sup> használják még: translational research, evidence based research, from bench to bedside medicine.

### 3.12 Diagnosztikai torzítás

Ahhoz, hogy egy új, bevezetésre váró teszt diagnosztikai pontosságát, ill. hatékonyságát meg tudjuk becsülni, az általa generált eredményeket össze kell vetni *in vitro* diagnosztikai tesztelésre alkalmas minősítésű, klinikai módszer által generált eredményekkel, amelyek optimális esetben, a beteg státuszát illetően valós állapotokat tükröznek. A nukleinsav alapú, *Aspergillus* infektológiai tesztek validálását jelentősen megnehezíti a diagnosztikai torzítás. A szerológiai, Platelia *Aspergillus* GM immunoesszé a rutin diagnosztikában a gold-standard-ként elfogadott, az általa generált eredmények (valós és fals egyaránt) befolyásolják az EORTC irányelvek szerinti kategorizálást. Mivel a jól beállított real-time PCR technikák szenzitívebbek lehetnek, mint a szerodiagnózis, előfordulhat, hogy egyébként valós pozitív PCR eredményeket fals találatként aposztrofálnak, ily módon csökkentvén az új módszer specificitását.

### 3.13 Intézményi infekciókontroll

Az opportunista, humán patogén, szisztémás, invazív mikózisokat előidéző fajok közül az *Aspergillus*ok jelentik a legnagyobb veszélyt a súlyos, krónikus neutropéniában szenvedő betegek számára (Pagano és mtsai, 2006, Pagano és mtsai 2007). Különösen az akut mieloid leukémiában (AML) szenvedő betegek vannak kitéve leginkább az infekció veszélyének (Pagano és mtsai, 2011). Ahhoz, hogy hatékonyan szállhassanak szembe a fertőzéssel, kiemelkedő jelentőséggel bír a megfelelő kórházi infekciókontroll. Ehhez egy olyan forgatókönyv felállítása szükséges, amely a rizikócsoportha tartozó betegek megfelelő kategorizálásán túl, alkalmas lehet annak eldöntésére, hogy szükséges-e az empirikus prevenció megkezdése, amely a betegség alacsony prevalenciájából adódóan gyakran feleslegesen terheli a betegek szervezetét. Szolid- és vérképzőszervi tumorok miatt kezelésben részesülő betegek körében különösen nagy hangsúlyt kell fektetni a kezelés során fellépő lázas neutropénia nyomkövetésére, hiszen klinikai adatok szerint, 15%-al növeli a halálozást (Lyman és mtsai, 2010). Csökkent immunitású betegcsoportok hatékony kezeléséhez a megfelelő fertőzésellenes stratégia kidolgozása elengedhetetlen. Ehhez pedig a klinikus szakorvos (az esetek többségében onkológus) mellett mikrobiológus, infektológus bevonása, ill. az egyes szakemberek közti megfelelő kommunikáció bír kiemelkedő fontossággal.

### 3.14 ISHAM-EAPCRI

Az ISHAM (International Society for Human and Animal Mycology) - EAPCRI (European *Aspergillus* PCR Initiative) egy nonprofit szervezet, létrejövetelének egyik fő célja, hogy a tagok összerendezett és koordinált munkájának köszönhetően megoldást találjon a nukleinsav alapú, invazív aszpergillózisokat detektáló eljárások legégetőbb hiányosságára, a standardizációra.

Első lépésként, 2006-ban az Egyesült Királyság mikózisokkal foglalkozó PCR-munkacsoportja (Fungal PCR Consensus group) közös megállapodással nyilvánosságra hozott egy gomba nukleinsav detektáláson alapuló PCR rendszerekre vonatkozó módszertani leírást, majd ezt követően még az év szeptemberében Párizsban megalakult, a 16 ország, 69 centrumának 86 laboratóriumi kutatóját, klinikusát egyesítő *Aspergillus*-PCR diagnosztikai munkacsoport (EAPCRI). Az ISHAM védnöksége alatt álló szervezet a hatékony és gördülékeny működés végett önálló vezetőséggel rendelkezik.

A laboratóriumi munkacsoport törzstagjai évente 2-3 alkalommal üléseznek. Kerekasztal megbeszéléseik során összegzik az elmúlt időszak eredményeit. Beszélnek továbbá közös, nemzetközi kooperációkon alapuló pályázati lehetőségekről.

A klinikai munkacsoport célja, hogy elemezze és összegezze a laboratóriumi és statisztikai munkacsoport új eredményeit a két másik tudományos szervezettel; EBMT-vel (European Society for Blood and Marrow Transplantation), és EORTC-vel együttműködve. Javaslattevéikkel instruálják a DNS alapú aszpergillusz diagnosztika nemzetközi, validációs, körkontrollos vizsgálatait.

A statisztikai munkacsoport munkája szervesen összefonódik a laboratóriumi munkacsoportéval akik a nemzetközi körkontrollos tanulmányok lebonyolítását koordinálják a statisztikai munkacsoport által megtervezett módon. Paneleket osztanak szét a résztvevő laboratóriumok között, amely panelek egyaránt tartalmaznak pozitív, azaz *Aspergillus fumigatus* patogén DNS tartalmú, ill. vak, azaz negatív, gomba DNS-t nem tartalmazó biológiai (főként totál vér és/vagy szérum) mintákat.

## 4. CÉLKITŰZÉSEK

- Aszpergillózist diagnosztizáló real-time esszék fejlesztése az invazív aszpergillózis legfőbb, ill. gyakori okozóiként ismert *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, ill. *Aspergillus lentulus* fajok genomjában meglévő *Streptomyces facC* génekkel ortológ génszakaszokra.
- Az *Aspergillus fumigatus* és *Aspergillus terreus* specifikus, *facC* ortológokhoz tervezett Taqman® esszék reakció hatékonyságának, analitikai szenzitivitásának, ill. specificitásának meghatározása.
- Az *Aspergillus fumigatus*, ill. *Aspergillus lentulus* fajoknak a jellemző olvadáspontjaik (olvadáspont analízis), leolvadási görbéik (HRM analízis) alapján történő azonosítása.
- Taqman® esszék dinamikus tartományának vizsgálata *Aspergillus fumigatus* ill. *Aspergillus terreus* konídium tartalmú, nagyszámú szérum mintán, automata nukleinsav izoláló rendszerben.
- A Taqman®-LNA próbás *Aspergillus fumigatus* specifikus real-time esszék validálása prospektív eset-kontroll tanulmány során a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézetével, valamint az Orvosi Mikrobiológiai, és Patológiai Intézetekkel együttműködve. Kombinált biológiai marker analízis során lázas, neutropeniás betegeket monitorozunk *Aspergillus* specifikus antitestek, ill. *Aspergillus fumigatus facC* ortológok jelenlétére, három napos nyomonkövetéssel. A kombinált biomarker analízisek eredményeit összevetjük egymással és a konvencionális módszerek eredményeivel, majd meghatározzuk az egyes módszerek diagnosztikai hatékonyságát.
- Részt veszünk az évenként legalább egy alkalommal megszervezett körkontrollos vizsgálatokban, lehetőséget teremtve saját fejlesztésű, *Aspergillus* gomba nukleinsav detektáláson alapuló, real-time diagnosztikai rendszereink továbbfejlesztésére, tesztelésére, valamint a nemzetközi mezőnyben elfoglalt helyünk felmérésére.

## 5. ANYAGOK és MÓDSZEREK

### 5.1 C-faktor homológok keresése BLAST programmal

Az C faktor fehérje aminosav szekvenciáját (4. ábra) BLAST (basic local alignment search tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) homológia kereső programmal vizsgáltuk. Fehérje adatbázisokban végeztünk keresést a bevitt szekvenciával. A PSI-BLAST program egy olyan algoritmus alapján működik, mely először egy hagyományos BLAST kereséssel kigyűjti a vizsgált szekvencia homológjait, majd ún. iterációs fázisok során ezekből többszörös összerendezéssel szekvenciaprofilit készít. Végezetül pedig ezzel a profillal végez újabb keresést a szekvenciaadatbázisban. Ezáltal távoli homológokat is megtalál. Manapság az egyik legalkalmasabb módszer ortológ gének felfedésére.

```
Streptomyces griseus factor C protein precursor
/organism = "Streptomyces albidoflavus"
/strain = "45H"
/function = "involved in the regulation of cytodifferentiation"
```

```
MPAATTSSPSRRGLLRLGGGLVAASAFGLSFGAGSAAAAPVATK
RFSLTEPSHDLFRHAKLHDARVQQSFTFDIVNRRLFVAQLKSGS
PDDSGDLCITQLDFSGNKLGHMYLLGFHGVSIGAQPVGADTYL
WTEVDVNSNARGTRLARFKWNNGATLSRTSSALAKHQVPGATE
MTCAIDPVNNRMAIRYLTASGRRYGIYNVADIAAGVYDKPLSDV
PHPTGLGTFQGYALYGSYVYQLTGPNPYGPDNPNPGNSYVSSVDV
NTGALVQRAFTTRAGSTLTFREPEGMGIYRТАAGEVRLFLGFASG
VAGDRRSNLFYKNVLI
```

#### 4. ábra. A C-faktor gén aminosav szekvenciája.

A szekrécióra került fehérje 324 aminosavból áll. A 38 aminosav hosszú szignálszekvencia levágódását követően az érett fehérjét 286 aminosav alkotja, molekulatömege 31038 Da (Bíró és mtsai, 1980). A C-faktort a DOTE Biológiai Intézetében (ma DE-ÁOK Humángenetikai Tanszék) sikerült elsőként a termelő *Streptomyces griseus* 45H (az új taxonómiai besorolás szerint *Streptomyces flavofungini* 45H) törzsének 72 órás tenyésztéséből izolálni (Bíró és mtsai, 1980; Birkó és mtsai, 1999).

## 5.2 Taqman® rendszerek

A Taqman® hidrolízis elven működő próbák alkalmazásának ötlete a Perkin-Elmer Corporation kutatóitól származik (Holland és mtsai, 1991).

Diagnosztikai teszteknel a specificitás rendkívül fontos tényező. A real-time rendszerű detektálással nemcsak nagyfokú szenzitivitásbeli, de a Taqman® hidrolízis elven működő próbák használatával rendkívül magasfokú specificitásbeli javulás is elérhető. Ez annak is köszönhető, hogy a megfelelő intenzitású (baseline feletti) fluoreszcens fénykibocsátás eléréséhez az előremutató és a hátramutató primereken (forward, ill. reverse) kívül a köztük elhelyezkedő, ugyancsak egyszálú „próba” DNS molekulának a templát szekvenciához való specifikus hibridizációjára is szükség van. Optimális esetben, jól beállított reakció paraméterek mellett és megfelelően megtervezett primer- és próba kombinációkkal amplifikáció csak a target régiókról történik, és már alig néhány nukleotid eltérés a primerek vagy a próba szekvenciájában akadályozza az aspecifikus szaporulatokat.

A FRET<sup>6</sup>, azaz a Fluoreszcencia Rezonancia Energia Transzfer dipólus-dipólus kölcsönhatás révén két, gerjesztett állapotú festék molekula; a fluorofór (donor) és a quencher (akceptor) közti, távolság függő, fluoreszcens sugárzás nélkül végbemenő energia átadási folyamat (Förster, 1948; Lakowicz 1999). A donor és az akceptor molekulákat úgy választjuk meg, hogy emissziós spektrumukban jelentős átfedés mutatkozzon, ezért amennyiben a két molekula közti távolság 2-10 nm-nél kevesebb, a donor (FAM<sup>TM 7</sup>) molekula által kibocsájtott fluoreszcenciát az akceptor (MGB<sup>8</sup>, DQD<sup>TM 9</sup>) molekula elnyeli.

A polimeráz reakció előrehaladtával, a hőstabil Taq-polimeráz enzim 5'→3' exonukleáz aktivitásának köszönhetően a próba 5' végéhez kovalensen rögzített fluorofór molekula lehasad, és távol kerül a próba 3' végéhez ugyancsak kovalensen kapcsolt akceptor molekulától, és a real-time reakciók kinetikájában egy arra alkalmas (CCD) kamerával exponenciálisan növekvő fluoreszcens szignál lesz detektálható, amelynek változása bármilyen posztamplifikációs folyamat közbeiktatása nélkül, az amplifikációkkal szimultán követhető a monitoron.

---

<sup>6</sup> FRET: Förster-féle rezonancia energia átadás

<sup>7</sup> 6-FAM<sup>TM</sup>: 6-carboxyfluorescein

<sup>8</sup> MGB: minor groove binder

<sup>9</sup> DQD<sup>TM</sup>: dark quencher dye

## 5.2.1 Taqman®-MGB esszék

A Taqman®-MGB próbás esszék tervezéséhez a LifeTechnologies online felületén elérhető FileBuilder 3.0 Primer Express® tervező programot használtuk. A tervezett Taqman®-MGB esszé primereinek és a próba elhelyezkedését az 5/a, 5/b, 5/c ábrák mutatják.

```
>A.fumigatuschr#3 /AFUA_3G14910/  
ATGACTCCGCTCGTCAAAGTCGGCAGCCTTCTGGCCGATTGCTCTGGGTACCTTTGGC  
ATCGGACAGTCAGCGCCAGCATCCCCATCCAAACGCTTCGATCTCTGCCCCCCTCC  
GCCGATCTTACCGTCACAAAGCCCTCCGCGATGACACAGTCCAGCAAGGATTCGCCCTT  
GACAAATGTCAACCGCCGCTTTTCGTCGCCAGCGCCGACGGCTCCTCCGAAACAGCG  
GGCGACCTAACAAATCACCCAGCTCGACTTTGACGGCAACTACGTCGGACACATGTACCTA  
AAGAGCTTTGGTTCATGGCGTCTCCTTCGGCGCGCAGGCCGTTGGGTCCGCAACCTACCTC  
TGGACCGAGGTCGACGCCAACGCCAACGGCTACGGCAAGCAACTCGCCCGCTTCAAGTTC  
GCCTCGGGCACCACGCTGACCAGCTCCTCCGCTCAACTGGCAAAGTTCAAGCCCGTCCGC  
GACGCAACGGAGCATACTTGCGCCATTGACCCGGTGTACAACCGGCTGATCGTCCGGTAT  
CACCTCAGCGGGTCAAAGCATATCGCCGTGTATGATCTTGTCTGCGGCGACGCGCGGGAT  
TTCTCCGCCCGCTGGCGAATTCAAGCAGCCGGAGTTGGAGACGCTGTCGTTGACTTTC  
CAGGGTTATGCAGCGTATGGACAGTATCTGTATCTGCTGACGGGAATTTCATATGCGGCC  
AGCGGAGGTAAAGTCAATTCCGAGGTAACCAGTGTGACATGAACACGGGCAAGGTGGTG  
CAGGGGCCACGCTACCAAGGCCGTTCCACGCTGGAGTTTAGAGAGCCGGAGGGATTA  
GCGATTTACAAGACGGCTCGGGGACAGTGAGGTTGTTCTTGGGGTTTGCCTCGGGGAAG  
CGGGTGATCGCAGGTCGAATCTGTTCTACAAGAAATGTGTTGTTTATAG
```

5/a ábra. *Aspergillus fumigatus* Af293 Ch#3 *facC* ortológ gén (AFUA\_3G14910) detektálására tervezett 62 bp hosszúságú ampikon primerjeinek és próbájának elhelyezkedése.

A Taqman®-MGB próba (5'-FAM-ACGCTGTCGTTGACTTT-3'-MGB, 17 mer) pirossal, az előremutató primer (5'-CAAGCAGCCGGAGTTGGA-3', 18 mer) szürkével, míg a hátramutató primer (5'-ACTGTCCATACGCTGCATAACC-3', 22 mer) késsel jelölt.

```
>A.fumigatuschr#5 /AFUA_5G00540/  
ATGGAGTCTCCCTCTTTGCTATCATCACAGCACTAACATGTGTGATTGCCAAAATCCCC  
GACTCTCCACGATTTCGACCTCACCACCGTTCGATGACCTTCGGCGGAACAAGAAAACC  
GCCGCCAAAACCGTCCAACAGTCATTACCTTTGACAACGTCAACCGCCGCTGTTTCATC  
GTAACCGTTCGCGATGGCTCCGCCCTCGACTCAGGAGACTTGACAATCAGCCAACCTCGAC  
TTCTCCGGAAAGTCTCCTCGGCTCAATGCACCTGCTCGGCTCGGCCACGCTGTGAACATC  
GCCCGGAACCAATCGGAAGCGATACGTATATCTGGAGTGAACCGACGCTGCAGCCAGC  
GGATACGGGACAGCATTGTGGAAGTTCAAGTTCAGAATGGCAAGACGTTGAATAGCGCC  
ACGGATAAGCGCAAGCGGATTGTGCCGTTGCCCGAGTTTGACAGGGGCACTGCCACAATT  
GACCCGTTTTATAAGCGTTGATCGTGCATACACAGACGGGGACCGTGCAGAACATCGCC  
CGCTTTGACCTTGTGAGGCGAGCGCAGGCAATTTTTCGAACCCACTGGCCAAATGGGAG  
ATTCCGCATCTCGTCAAGGAGCTCGGGCAAAGGTTAACGCTTTTCAGGGATATACAGCT  
TACGGGCGGTATGTCTATTTCTGACTGGGGAATCTTATGACGCTAGTGGTGGTAAGCTG  
AATTCAGAGGTTATGGCTCTGGACTTGAATACTGGGAAGCTTGTGCAAGGGCCTGTACC  
ACAAAGGCGGGTTCGACGTTGAAATTTCTGAGCCGGAGGGGATGGCAATCTATAAGACG  
GCCAGTGGGGAGGTGAGGCTTTTCTTGGGATTCGCGTTCGGGGTTGCAAGGACCCGGAG  
AGTAATCTGTTTTACAAGAACCGCCTGATATAG
```

5/b ábra. *Aspergillus fumigatus* Af293 Chr#5 *facC* ortológ gén (AFUA\_5G00540) detektálására tervezett 56 bp hosszúságú ampikon primerjeinek és próbájának elhelyezkedése.

A Taqman®-MGB próba (5'-FAM-CGACCTCACCAAACC-3'-MGB, 15 mer) pirossal, az előremutató primer (5'-AATCCCCGACTCTCCACGAT-3', 20 mer) szürkével, míg a hátramutató primer (5'-TCCGCCAGAGGTCATACGA-3', 19 mer) késsel jelölt.

```

>A.terreus /ATEG_03536/
ATGCGTCCCTTTCCCAAACACTATTGTACTCCTCGCATCCAGCGTAAGCCTGGCTTGGGCG
GCGTACCGTCTTCTTCCCAATTCGACCTGTCAGCGCCATCTTACGACCTCTTCCGCAGC
AAGCCCCCTTGCTGACGCGACAGTCCAACAAGGCTTCTCCTTCGACAATGTCAATCATCGC
CTCTTTGTGCGCCCAACGCCGCGACGGGTCCTCCGAAACCGCCGGCGATCTGTGTATCACC
CAGCTTGATTTCCACGGAAACATTGTCGGATCAATGGACCTGATCGGGTTTGGCCACGGC
GTGTCTTTGCGCGTCAGCCAGTCGGTTTCGTGACATACCTCTGGACCGAGGTGATGCC
AACTCGAATGGATACGGGAAGAAGCTCGCCCGGTTCAAGTTTGTCAATGGCAAACCTGTG
TCGCATACCGATGCCTCGCTCGCGAAATTCACTGCTGTTGAGGGTGCAACGGAGCACACC
TGCTCTATTGACCCGGTGAATAACCGGCTCGTGGTCCGATATGCTCTGAGCGGGAAAAG
CGCATTTGCCGTGTTTCGATCTGGGGGCCGCAACAAAGGGTGACTTTTCTACGAAACTGGCG
GATATCGCTCATCCTTCGCTGGATACGCTATCCAAGGTGTTCCAGGGGTATGCTGCATAT
GGAAAGTACGTCTATCTTCTTACGGGAGAGTCGTACGCTGCTTCTGGTGGTGTGGTCAAC
TCGCAGGTGACCGCGTGGACTTGAATACTGGGAAGGTGGTCCAGGGTCCGACGCTGACC
AAGCGGGCTCAACCTCTCGTTCGTTCCGTGAGCCGGAAGGACTGGCTATTTACCGCACCGAT
GCCGGGGAGGTGAGACTGTTCTTGGGATTTGCCTCTGGGGAGGCTGGCGACAGAAGGTGCG
AATCTGTTCTACAAGAATGCTATGGTATAG

```

5/c ábra. *Aspergillus terreus* IH2624 *facC* ortológ gén (ATEG\_03536) detektálására tervezett 78 bp hosszúságú amplikon primerjeinek és próbájának elhelyezkedése.

A Taqman®-MGB próba (5'-FAM-AAGTTTGTCAATGGCAA-3'- MGB, 17 mer) pirossal, az előremutató primer (5'-CGAATGGATACGGGAAGAAGCT-3', 22 mer) szürkével, míg a hátramutató primer (5'-CGAGCGAGGCATCGGTATG-3', 19 mer) kékkel jelölt.

Az MGB próbás esszéink rövid leírását a 2. táblázat-ban adjuk meg.

2. táblázat. *Aspergillus fumigatus* Af293 (Taqman®-MGB1, Taqman®-MGB2, Taqman®-MGB3) és *Aspergillus terreus* NIH2624 (Taqman®-MGB4) specifikus, real-time esszék jellemzése.

---

MGB próbás Taqman® esszék

---

<b>MGB1</b>	<i>Aspergillus fumigatus</i> Chr3 <i>facC</i> ortológ génhez (AFUA_3G14910) hibridizáló, Taqman®- MGB esszé, szekvencia specifikus primerekkel.
<b>MGB2</b>	<i>Aspergillus fumigatus</i> Chr5 <i>facC</i> ortológ génhez (AFUA_5G00540) hibridizáló, Taqman®- MGB esszé, szekvencia specifikus primerekkel.
<b>MGB3</b>	<i>Aspergillus fumigatus</i> Chr3 (AFUA_3G14910) és <i>Aspergillus fumigatus</i> Chr5 (AFUA_5G00540) <i>facC</i> ortológ génekhez hibridizáló, Taqman®-MGB esszé, szekvencia specifikus primerekkel, 1:1 arányban.
<b>MGB4</b>	<i>Aspergillus terreus</i> (ATEG_03536) <i>facC</i> ortológ génhez hibridizáló, Taqman®-MGB esszé, szekvencia specifikus primerekkel.

---

## 5.2.2 Taqman®-LNA esszé

Taqman®-LNA próbás esszé rendszerek tervezését a Roche Applied Science honlapon található Universal Probe Library System Assay Design Center elektronikus felületén (<http://lifescience.roche.com/shop/products/universal-probelibrary-system-assay-design>) végeztük. A Taqman®-LNA próbás esszé rendszereink primer-, ill. próba szekvenciáit az 6/a, 6/b, 6/c ábrák mutatják.

```
>A.fumigatuschr#3 /AFUA_3G14910/  
ATGACTCCGCTCGTCAAAGTCGGCAGCCTTCTGGCCGATGCTCTGGGTCACCTTTGGG  
ATCGCGACAGTCAGCGCCAGCATCCCTCATCCAAACGCTTCGATCTCTCTGCCCCCTCC  
GCCGATCTCTACCGTCAACAAGCCCTCCGCGATGACACAGTCCAGCAAGGATTCGCCTTT  
GACAAATGTCAACCGCCGCTTTTCGTCGCCAGCCGCGACGGCTCCTCCGAAACAGCG  
GGGACCTAACAATCACCCAGCTCGACTTTGACGGCAACTACGTCGGACACATGTACCTA  
AAGAGCTTTGGTCATGGCGTCTCCTTCGGCGCGCAGGCCGTTGGGTCCGCAACCTACCTC  
TGGACCGAGGTCGACGCCAACGCCAACGGCTACGGCAAGCAACTCGCCCGCTTCAAGTTC  
GCCTCGGGCACCACGCTGACCAGCTCCTCCGCTCAACTGGCAAAGTTCAGCCCGTCGCC  
GACGCAACGGAGCATACCTGCGCCATTGACCCGGTGTACAACCGGCTGATCGTCCGGTAT  
CACCTCAGCGGGTCAAAGCATATCGCCGTGTATGATCTTGCTGCGGGCAGCGCGGGCAT  
TTCTCCGCCCGCTGGGGAACCTCAAGCAGCCGGAGTTGGAGACGCTGTGTTGACTTTC  
CAGGGTTATGACGCTATGGACAGTATCTGTATCTGCTGACGGGAACCTCATATGCGGCC  
AGCGGAGGTAAGTCAATTCCGAGGTAACCAGTGTGACATGAACACGGGCAAGGTGGTG  
CAGGGGCCACGCTCACAAGCCGGTTCACGCTGGAGTTTAGAGAGCCGGAGGGATTA  
GCGATTTACAAGCAGGCTGCGGGCAGGTGAGGTTGTTCTGGGGTTGCTTCGGGGAAG  
CGGGTGATCGCAGTCAATCTGTTCTACAAGATGTGTTGGTTAG
```

6/a ábra. *Aspergillus fumigatus* Af293 Ch#3 *facC* ortológ gén (AFUA\_3G14910) detektálására tervezett 66 bp hosszúságú ampikon primerjeinek és próbájának elhelyezkedése.

A Taqman-esszé próba szekvenciája (5'-FAM-CAGCATCC-VIC-3', 8 mer) pirossal, az előremutató (5'-CTTTGGCATCGCGACAGT-3', 18 mer) primer szürkével, a hátramutató primer (5'-GAGGGGGCAGAGAGATC-3', 17 mer) kékkel jelölt.

```
>A.fumigatuschr#5/AFUA_5G00540/  
ATGCGAGTCTCCCTCTTTGCTATCATCACAGCACTAACATGTGTGATTGCCAAAATCCCC  
GACTCTCCACGATTCGACCTCACAAACCGTTCGTATGACCTCTGGCGGAACAAGAAAACC  
GCCGCCAAAACCGTCCAAACAGTCATTCACCTTTGACAACGTCAAACCGCCCTGTTCATC  
GTAAACCGTCGCGATGGCTCCGCCCTCGACTCAGGAGACTTGACAATCAGCCAACTCGAC  
TTCTCCGAAAAGTCCCTCGGCTCAATGCACCTGCTCGGCTGCGGCCACGGTGTGAACATC  
TCCGCGGAACCAATCGGAAGCGATACGTATATCTGGAGTGAAACCGACGCTGCAGCCAGC  
GGATACGGGACAGCATTGTGGAAGTTCAAGTTCAGAATGGCAAGACGTTGAATAGCGCC  
ACGGATAAGCGCAAGCGGATTGTGCCGTTGCCGAGTTTGACAGGGGCACCTGCCACAATT  
GACCCCGTTTTATAAGCGGTTGATCGTGCATACAGACGGGGACCGTGCAGAACATCGCC  
GCGTTTGACCTTGCTGAGGCGAGCGCAGGCAATTTTTCGAACCCACTGGCCAAATGGGAG  
ATTCGCATCTCGTCAAGGAGCTCGGGGCAAAGGTTAACGCTTTTCAGGGATATACAGCT  
TACGGGCGGTATGCTATTTTCTGACTGGGGAATCTTATGACGCTAGTGGTGGTAAGCTG  
AATTCAGAGGTTATGGCTCTGGACTTGAATACTGGGAAGCTTGTGCAAGGGCCTGTCAAC  
ACAAAGGGGGTTCGACGTTGAAATTTCTGAGCCGGAGGGGATGGCAATCTATAAGACG  
GCCAGTGGGGAGGTGAGGCTTTTCTTGGGATTCGCGTGGGGGTTGCAGGAGACCGGAGG  
AGTAATCTGTTTACAGAACCGCTGATATAG
```

6/b ábra. *Aspergillus fumigatus* Af293 Ch#5 *facC* ortológ target gén (AFUA\_3G14910) detektálására tervezett 64 bp hosszúságú ampikon primerjeinek és próbájának elhelyezkedése.

A Taqman®-esszé próba szekvenciája (5'-FAM-CCGCCGCC-VIC-3') pirossal, az előremutató (5'-CGTCCAACAGTCATTCACCTT-3', 21 mer) primer szürkével, a hátramutató primer (5'-ATCGCGACGGTTACGAT-3', 18 mer) kékkel jelölt.

```

>A.terreus /ATEG_03536/
ATGCGTCCCTTTCCTCCAAACTATTGTACTCCTCGCATCCAGCGTAAGCCTGGCTTGGGCG
GCCTACCGTCTTCTTCCCAATTGACCTGTCAGCGCCATCTTACGACCTCTTCCGCAGC
AAGCCCTTGTGACGCGACAGTCCAACAAGGCTTCTCCTTCGACAATGTCAATCATCGC
CTCTTTGTGCGCCAACGCGCGACGGGTCTCCGAAACCGCGGCGATCTGTGTATCACC
CAGCTTGATTTCCACGAAACATTGTCCGATCAATGGACCTGATCGGGTTTGGCCACGGC
GTGTCCTTTGCCGCTCAGCCAGTCGGTTCGTGACATACCTTGGACCGAGGTCGATGCC
AACTCGAATGGATACGGGAAGAAGCTCGCCCGGTTCAAGTTGTCAATGGCAAACCTCTG
TCGCATACCGATGCCTCGCTCGCGAAATTCACTGCTGTTGAGGGTGCAACGGAGCACACC
TGCTCTATTGACCCGGTGAATAACCGGCTCGTGGTCCGATATGCTCTGAGCGGAAAAAG
CGCATTGCCGTGTTTCGATCTGGGGCCGCAACAAGGGTGACTTTTCTACGAAACTGGCG
GATATCGCTCATCCTTCGCTGGATACGCTATCCAAGGTGTTCCAGGGGTATGCTGCATAT
GGAAAGTACGTCTATCTTCTTACGGGAGAGTCGTACGCTGCTTCTGGTGGTGTGGTCAAC
TCGAGGTGACCGCGTGGACTTGAATACTGGGAAGGTGGTCCAGGTCCGACGCTGACC
AAGGCGGGCTCAACCTCTCGTTCGGTGGAGCCGGAAGGACTGGCTATTTACCGCACCGAT
GCCGGGGAGGTGAGACTGTTCTTGGGATTTGCCTCTGGGGAGGCTGGCGACAGAAGGTCG
AATCTGTTCTACAAGAATGCTATGGTATAG

```

6/c ábra. *Aspergillus terreus* NIH2624 *facC* ortológ target gén (ATEG\_03536) detektálására tervezett 77 bp hosszúságú amplikon primerjeinek és próbájának elhelyezkedése.

A Taqman®-esszé próba szekvenciája (5'-FAM-CATCCAGC-VIC-3') pirossal, az előremutató (5'-CCTTTCCTCCAAACTATTGTATCC-3'; 25 mer) primer szürkével, a hátramutató primer (5'-AATTGGGAAGAAGACGGTAGC-3'; 21 mer) kékkel jelölt.

Az MGB próbás esszéink rövid leírását a 3. táblázat-ban adjuk meg.

3. táblázat. *Aspergillus fumigatus* Af293 (Taqman®-LNA1, Taqman®-LNA2, Taqman®-LNA3) és *Aspergillus terreus* NIH2624 (Taqman®-LNA4) specifikus real-time esszék jellemzése.

LNA próbás Taqman® esszék	
<b>LNA1</b>	<i>Aspergillus fumigatus</i> Chr3 <i>facC</i> ortológ génhez (AFUA_3G14910) hibridizáló, Taqman®- LNA esszé, szekvencia specifikus primerekkel.
<b>LNA2</b>	<i>Aspergillus fumigatus</i> Chr5 <i>facC</i> ortológ génhez (AFUA_5G00540) hibridizáló, Taqman®- LNA esszé, szekvencia specifikus primerekkel.
<b>LNA3</b>	<i>Aspergillus fumigatus</i> Chr3 (AFUA_3G14910) és <i>Aspergillus fumigatus</i> Chr5 (AFUA_5G00540) <i>facC</i> ortológ génekhez hibridizáló, Taqman®-LNA esszé, szekvencia specifikus primerekkel, 1:1 arányban.
<b>LNA4</b>	<i>Aspergillus terreus</i> (ATEG_03536) <i>facC</i> ortológ génhez hibridizáló, Taqman®-LNA esszé, szekvencia specifikus primerekkel.

### 5.3 Mono-, ill. dual-copy Taqman® esszék fejlesztése

Kétféle Taqman® rendszerű esszét terveztünk. A Taqman®-MGB próbás rendszerek a *Taqman® Gene Expression MasterMix*-ekre (Cat. No.: 4369016), míg a Taqman®-LNA próbák a *LightCycler® Probes MasterMix*-ekre (Cat. No. 04 707 494 001) lettek optimalizálva. Ez utóbbiban a *Taq-polimeráz* egy módosított változata, a *FastStart Taq polimeráz* található. Használatával specifikusabbá és hatékonyabbá tehetőek a real-time reakciók, hiszen a hőstabil, rekombináns enzim 95°C alatt inaktív (4 perc, 95°C-on be kell kapcsolni), ennek következtében elkerülhetőek a nem kívánt, aspecifikus szaporulatok, amelyek a PCR reakciók korai szakaszában, még a reakciók összemérése során keletkeznének jóval az optimális anellációs hőfok alatt.

Az MGB-NFQ<sup>10</sup> próbákat, ill. az LNA<sup>11</sup> próbákat alkotó, módosított nukleotid analóg 2'-O és a 4'-C atomjai közt létrehozott keresztkötéseknek köszönhetően, erős hibridizációt biztosítanak az egyszálú templát DNS-hez. Rövid (6-10 mer) méretük ellenére is magas T<sub>m</sub> értékkel, míg egyedülálló hőstabilitásuknak, ill. rövid méretüknek köszönhetően, rendkívül magas diszkriminációs hatásfokkal rendelkeznek. Mind az MGB, mind pedig az LNA próbák 5' végükön FAM jelöltek, 3' végükön speciális kioltó (NFQ) molekulákkal.

Összesen nyolc különböző Taqman® hidrolízis esszét (4 Taqman®-MGB ill. 4 Taqman®-LNA próbás) fejlesztettünk *Aspergillus fumigatus* és *Aspergillus terreus* fajok azonosítására. A **mono-copy** rendszerek esetében csak egyetlen target gén található. Mivel az *Aspergillus fumigatus* genomjában egyszerre két példányban (AFUA\_3G14910, AFUA\_5G00540) is találhatóak *facC* ortológ gének, ezért az *Aspergillus fumigatus* diagnosztizáló rendszerek esetében fejlesztettünk ún. **dual-copy** esszétet is. Ez utóbbiak esetében, egyetlen real-time PCR reakció során négy szekvencia specifikus primer és két, ugyanazt a fluorofórt tartalmazó próba használatával egyszerre két génről, szimultán történik az amplifikáció.

---

<sup>10</sup> MGB-NFQ = Minor Groove Binder Non fluorescent quencher. 3' végükhöz kapcsolt speciális kioltó protein molekuláknak; non fluorescent quencher.

<sup>11</sup> LNA próbák = Locked Nucleic Acids. Egyszálú, kémiaiilag módosított Taqman® hidrolízis próbák, melyek a kémiai módosításuknak köszönhetően erősebben hibridizálnak a templát nukleinsavakhoz.

### 5.3.1 Genomi DNS kinyeréséhez használt fonalas gombák tenyésztésének körülményei

Három (*Aspergillus fumigatus* AF293), ill. hét napos (*Aspergillus terreus* NCCB IH2624 ill. *Aspergillus lentulus* SZMC3118) törzsek spóra szuszpenzióit használtuk inokulumként és tenyésztettük folyékony, glükóz tartalmú, minimál táptalajon (AMM) (Baratt és mtsai, 1965). A tenyésztési hőmérsékletek az *Aspergillus fumigatus* Af293 és *Aspergillus lentulus* SZMC3118 törzsek esetén 37°C, az *Aspergillus terreus* IH2624 esetén 25°C voltak 18 órás, 220 rpm rázatás mellett. Az inokulumként használt konidiumokat PBS-0.01 % Tween 80-ban mostuk, hogy elkerüljük a spórák összecsapzódását, így a tömény szuszpenziók spóra tartalma is könnyen és pontosan meghatározható volt Bürker kamrában.

### 5.3.2 Genomi DNS izolálás fonalas gombákból

Patogén gombák felületi tenyészeit mechanikus lízissel folyékony nitrogénben tártuk fel (Baratt és mtsai, 1965) és DNS-t izoláltunk (Thermo Scientific, Maryland, USA) a forgalmazó által megadott instrukcióknak megfelelően. A törzsek tenyésztését, ill. a gDNS izolálását a Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékén Leiter Éva végezte.

### 5.3.3 Genomi ekvivalens és kolóniaképező egységek

A genomi ekvivalens (GE) egy adott faj egyetlen genomját reprezentáló DNS mennyiségét jelenti. A kolónia-képező egység (CFU) azon élő képletek számára utal, amelyek szilárd táptalaj felületen telepeket hoznak létre.

#### 4. táblázat. *Aspergillus fumigatus* AF293 és *Aspergillus terreus* IH2624 fajok genom mérete.

Fajok	Genom méret (Mb)	GC %	Gének száma
<i>Aspergillus fumigatus</i> AF293	29,38	49,8	9 887
<i>Aspergillus terreus</i> IH2624	29,33	52,9	10 406

Az adatok a Broad Institute <http://www.broadinstitute.org> honlapról származnak.

Ha figyelembe vesszük, hogy a DNS-ben egy bázispár 617,5 g/mol tömegű (A = 313 g/mol, T = 304 g/mol, G = 329 g/mol, C = 289 g/mol), akkor a Broad Institute által közölt adatok és az alábbi információk ismeretében;

*Aspergillus fumigatus* Af293 genom mérete kalkulálható a következő módon =

$$\begin{aligned} & 29,38 \times 10^6 \text{ bp} \curvearrowright \\ & 617,5 \times (29,38 \times 10^6 \text{ g/mol}) \\ & 1,815 \times 10^{10} \text{ g/mol} \end{aligned}$$

Avogadro állandó ( $6 \times 10^{23}$ ) értelmében =

$$\begin{aligned} & 1,815 \times 10^{10} / 6 \times 10^{23} \curvearrowright \\ & 0,303 \times 10^{-13} \text{ g} \curvearrowright \\ & 3 \times 10^{-14} \text{ g} \curvearrowright \end{aligned}$$

$$\mathbf{3 \times 10 \text{ fg} = 30 \text{ fg}}$$

*Aspergillus terreus* IH2624 genom mérete kalkulálható a következő módon =

$$\begin{aligned} & 29,33 \times 10^6 \text{ bp} \curvearrowright \\ & 617,5 \times (29,33 \times 10^6 \text{ g/mol}) \\ & 1,811 \times 10^{10} \text{ g/mol} \end{aligned}$$

Avogadro állandó ( $6 \times 10^{23}$ ) értelmében =

$$\begin{aligned} & 1,811 \times 10^{10} / 6 \times 10^{23} \curvearrowright \\ & 0,303 \times 10^{-13} \text{ g} \curvearrowright \\ & 3 \times 10^{-14} \text{ g} \curvearrowright \end{aligned}$$

$$\mathbf{3 \times 10 \text{ fg} = 30 \text{ fg}}$$

Mind az *Aspergillus fumigatus* AF293, mind pedig az *Aspergillus terreus* IH2624 fajok haploid genomja 15 fg-nak adódik. Az *Aspergillus lentulus* genom méretét, a szekvenciája ismeretének hiányában az *Aspergillus fumigatus* Af293 és *Aspergillus terreus* IH2624 genomok méretét alapul véve ugyancsak 29,4 Mb-nak és 15 fg-nak becsültük.

#### 5.3.4 PCR amplifikációs kontrollok

A különböző, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, ill. *Aspergillus lentulus* gDNS koncentrációjú minták real-time rendszerű analízise során minden egyes futás tartalmazott megfelelő belső kontrollokat.

- ❖ **PCR-IC** (PCR inhibíciós kontroll): real-time analízisek gDNS ( $10^2$ - $10^3$  GE) tartalmú inhibíciós kontrollja.
- ❖ **PCR-NTC** (PCR non-templát kontroll): nukleáz mentes vizet tartalmazó, amplifikációs reakció, a real-time reagensek tisztaságának ellenőrzésére.

### 5.3.5 Reakció pozitívítás és minta pozitívítás

A reagens csőben kivitelezett és online monitorozott nukleinsav amplifikáció abban az esetben tekinthető pozitívnak, amennyiben a reakció fluoreszcencia változásának mértéke meghaladja a reakcióban mért háttér (baseline<sup>12</sup>) sugárzás mértékét. Az így kapott Ct<sup>13</sup> (crossing threshold) érték fogja kijelölni a reakció kinetikai görbéjén az ehhez a bizonyos áttörési (inflexiós) ponthoz tartozó ciklus számot. Amennyiben viszont vagy nem kapunk Ct értékeket, vagy a kapott értékek túl szélsőségesnek bizonyulnak ( $Ct \geq 46$ ), akkor a vizsgált mintát negatívnak tekintjük (White és mtsai, 2010/b).

Az aszpergillózis diagnosztikában két vagy három párhuzamos PCR futás eredményeinek ismeretében határozzuk meg a vizsgált (biológiai) minta pozitív, ill. negatív státuszát. Továbbá, ellentmondás mutatkozik a szakirodalmi adatokban arra vonatkozóan, hogy szükséges-e két, egymással egybehangzó pozitív PCR eredmény az invazív aszpergillózis igazolásához.

Ennek a kérdésnek a megválaszolására Mengoli és munkatársai meta-analízisükben a 2000-2008 közt eltelt időszak során publikált, 16 tanulmány, 1618 invazív aszpergillózis (EORTC-MSG bizonyított vagy valószínű kategóriába sorolt) betegétől származó 10 000 biológiai mintán végzett PCR analízisek eredményeit összegezték. Nagy számú adat analízisét követően arra jutottak, hogy a pozitív minták számának növelése nem korrelált a diagnosztikai pontossággal, azaz az egyszeri PCR pozitív eredmény diagnosztikai pontosságát leíró index [DOR (95% CI) = 16.00 (8,60-29.79)], valamivel magasabbnak bizonyult a kétszeri, egybehangzó, pozitív PCR eredményekénél [DOR (95% CI) = 15,97 (6,83-37.34)] (Mengoli és mtsai, 2009). Ez többek között azzal is magyarázható, hogy a szigorúsági fok növelésével elmulaszthatunk valós pozitív eredményeket.

---

<sup>12</sup> Háttér vagy zajsugárzás, amely a ciklusok kezdeti szakaszában tapasztalható (általában a 3-15. ciklus), ahol az amplifikáció következtében még nem tapasztalható szignifikáns fluoreszcencia szignál növekedés.

<sup>13</sup> Ct (crossing threshold) vagy Cp (crossing point) avagy az a ciklusszám, ahol az amplifikáció gerjesztett fluoreszcencia szignál meghaladja a fluoreszcencia thresholdot, a háttér fluoreszcenciát (baseline).

## 5.4 Taqman® esszék dinamikus tartományának és analitikai specificitásának mérése

A real-time diagnosztikai esszék validálásának fontos lépése dinamikus tartományuk; így **reakció hatékonyságuknak**, valamint **detektációs küszöbüknek** és az **analitikai specificitásuknak** meghatározása.

- ❖ A real-time detektálás szenzitivitása és specificitása jelentősen függ az amplifikációs **reakciók hatékonyságától** ( $\text{PCR efficiency} = E^{14}$ ), így a megfelelően beállított PCR reakció körülményektől ( $\text{MgCl}_2$  koncentráció, anellációs ciklus hőmérséklete, extenziós ciklus hossza) a megtervezett primerek tapadásától és azoknak esetleges dimer képzésre való hajlamuktól, valamint az alkalmazott real-time készülékektől egyaránt.
- ❖ Egy real-time esszé **analitikai szenzitivitását** az a legalacsonyabb templát DNS mennyiség (GE) jelöli ki, amelynél még mérhető baseline feletti fluoreszcencia szignál emelkedés. Szokták ezt **detektációs- (LoD)<sup>15</sup> küszöbnek** is (Limit of Detection) nevezni.
- ❖ Egy bizonyos esszé **analitikai specificitása** pedig attól függ, hogy az milyen mértékben képes különbséget tenni a templáttal nagyon hasonló nukleinsav targetek között, azaz milyen mértékben ad fals pozitív eredményeket.

---

<sup>14</sup> Némi ellentmondás mutatkozhat a PCR efficiency értékeket illetően. Dolgozatomban %-os értékeket használok, s ezekben az esetekben az az általánosan elfogadott elv, hogy 85-115 %-os PCR hatékonyság tekinthető optimálisnak. Egy más megközelítés szerint pedig 100%-os reakció hatékonyság mellett, az amplicon mennyisége ciklusonként megduplázódik, ebben az esetben értéke  $E = 2$ . Ilyen értelemben pl. egy 85%-os hatékonyság  $2 \times 0,85 = 1,7$ -nek felelne meg, stb. Ezen esetekben  $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$ .

<sup>15</sup> LoD (limit of detection) = az a legalacsonyabb kiindulási templát DNS mennyiség amelynél a mért, és az átlagolt  $C_p$  értékek 10-es alapú logaritmusára illesztett egyenes meredeksége a  $-3,1$ - $-3,6$  értéktartományba és így az esszék reakció hatékonysága a 110%-90% tartományba esik.

### 5.4.1 Taqman® esszék dinamikus tartományának mérése gDNS paneleken

Az egyes esszék **reakció hatékonyságának**, ill. **detektációs küszöbének** megállapításához standard sorokat (panelek) készítettünk a fonalas gombák genomi DNS izolátumaiból, így meghatároztuk esszéink **dinamikus tartományát**, amely nem más, mint egy kellően széles koncentráció tartományt lefedő (optimális esetben a detektációs küszöbtől indul és legalább 5-7- $\log_{10}$  tartományt fed le) standard görbe.

Tömény *Aspergillus fumigatus* AF293, *Aspergillus terreus* NCCB IH2624 genomi DNS (gDNS) izolátumok koncentrációját fotometrálassal (NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer V3.7) határoztuk meg.

*Aspergillus fumigatus* AF293, *Aspergillus terreus* NCCB IH2624 fajok genomi DNS izolátumaiból 25 tagból álló, 15 ng - 15 fg (7- $\log_{10}$ ) tartományú hígítási sorozatokat készítettünk (5. táblázat) nukleázmentes vízben (Ambion PCR grade water). Mintánként három párhuzamos reakcióval dolgoztunk, majd sikeres amplifikációt követően a kapott Cp értékeket átlagoltuk és kalibrációs egyenest illesztünk az egyes mintákhoz rendelt Cp értékek és ismert DNS tartalmuk 10-es alapú logaritmusának függvényében kapott pontokra. A kapott lineáris görbék meredekségéből ( $y = mx + b$ ) reakció hatékonyságot ( $E = \text{efficiency}$ ) számoltunk az alábbi egyenlet képletébe való behelyettesítésével.

$$E = 10^{(-1/\text{Slope})} - 1$$

$E$  = adott real-time esszé amplifikációs hatékonyságát kifejező, becsült standard érték, mely optimális esetben 90-110%.

A Taqman®-MGB próbás real-time esszék reakció hatékonyságának mérését és detektációs küszöbének meghatározását *LightCycler 7500 Real-time PCR System* készüléken, míg a Taqman®-LNA próbás esszéinkét a Roche *Light Cycler 480 Instrument II* készüléken végeztük. A vizsgált templát térfogata minden esetben 8  $\mu$ l-nek adódott.

**5. táblázat. Taqman®-MGB1, 2, 3, 4 és Taqman®-LNA1, 2, 3, 4 real-time esszék reakció hatékonyságának és analitikai szenzitivitásának méréséhez használt panelek jellemzése.**

Panel neve		Taqman® panel-1	Taqman® panel-2
Panel gDNS tartalma		<i>A. fumigatus</i> Af293	<i>A. terreus</i> IH2624
GE/20 µl	log <sub>10</sub> GE/20 µl	DNS koncentráció	DNS koncentráció
10e6	6	15 ng	15 ng
7,5x10e5	5,88	11,25 ng	11,25 ng
5x10e5	5,70	7,5 ng	7,5 ng
2,5x10e5	5,40	3,75 ng	3,75 ng
10e5	5	1,5 ng	1,5 ng
7,5x10e4	4,88	1,125 ng	1,125 ng
5x10e4	4,70	0,75 ng	0,75 ng
2,5x10e4	4,40	0,375 ng	0,375 ng
10e4	4	150 pg	150 pg
7,5x10e3	3,88	1125 pg	1125 pg
5x10e3	3,70	75 pg	75 pg
2,5x10e3	3,40	37,5 pg	37,5 pg
10e3	3	15 pg	15 pg
7,5x10e2	2,88	11,25 pg	11,25 pg
5x10e2	2,70	7,5 pg	7,5 pg
2,5x10e2	2,40	3,75 pg	3,75 pg
10e2	2	1,5 pg	1,5 pg
75	1,88	1,125 pg	1,125 pg
50	1,70	0,75 pg	0,75 pg
25	1,40	0,375 pg	0,375 pg
10	1	0,150 pg	0,150 pg
7,5	0,88	112,5 fg	112,5 fg
5	0,70	75 fg	75 fg
2,5	0,40	37,5 fg	37,5 fg
1	0	15 fg	15 fg

*Aspergillus fumigatus* specifikus esszék reakció hatékonyságát és detektációs küszöbét (Taqman®-MGB1, 2, 3, Taqman®-LNA1, 2, 3) a Taqman® panel-1-en, *Aspergillus terreus* specifikus esszék (Taqman®-MGB4, LNA4) a Taqman® panel-2-n mértük.

## 5.4.2 Taqman® esszék analitikai specificitásának mérése gDNS paneleken

Optimális esetben, jól beállított reakció paraméterek esetén és megfelelően megtervezett primer- és próba szekvenciákkal amplifikáció csak a target régiókról történik.

- ❖ Taqman®-MGB esszéink specificitását vizsgáltuk 200 ng humán placenta (Sigma D3035) ill. számos prokarióta (*Escherichia coli*, *Streptomyces albidoflavus* 45H, *S. griseus* 52-1, *Streptomyces lividans* 1326, *Streptomyces albus* R-55, *Streptomyces flavofungini*) ill. eukarióta patogén gomba klinikai izolátumainak (*Aspergillus fumigatus* 1100, *Aspergillus fumigatus* 680/10, *Aspergillus fumigatus* 1156/10, *Aspergillus fumigatus* 893/10, *Aspergillus fumigatus* 902/10, *Aspergillus fumigatus* 666/10, *Aspergillus fumigatus* 852/10, *Aspergillus fumigatus* 540/10, *Aspergillus fumigatus* 884/10, *Aspergillus terreus* NCCB IH2624, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus lentulus* 3118, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus pseudotamarii*, *Aspergillus tubingensis*, *Candida albicans*), valamint apatogén gombák (*Trichoderma reesei*, *Penicillium chrysogenum*) genomi DNS-én. A tesztelt DNS izolátumok koncentrációja 7 ng – 17 pg/μl tartományú volt, amely megfelelően magas ahhoz, hogy ha a fajok közt bármilyen kereszt reakció lépne fel, akkor azt detektálhassuk, viszont kellően alacsony ahhoz, hogy az izolátumokban, esetlegesen háttérszennyezésként jelen levő, *Aspergillus* eredetű kontamináció kihíguljon belőlük.
- ❖ Taqman®-LNA3 és Taqman®-LNA4 esszék specificitását az ISHAM-EAPCRI által 2013-ban (2013/08/20) kibocsátott körkontrollos paneleken vizsgáltuk, amely tartalmazta a következő izolátumok (*Aspergillus fumigatus*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, *Cunninghamella sp.*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Aspergillus terreus*, *Absidia sp.*, *Aspergillus versicolor*, *Scedosporium sp.*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus lentulus*, *Aspergillus flavus*) valamelyikét különböző koncentrációban.

## 5.5 Olvadáspontról az *Aspergillus fumigatus* és *Aspergillus lentulus* fajok azonosítására

Az ISHAM-EAPCRI 2013/08/20 körkontrollos panel feldolgozásával kapott eredmények kiértékelését követően azt tapasztaltuk, hogy az *Aspergillus fumigatus* specifikus Taqman®-LNA3 esszé képes volt az *Aspergillus lentulus* gDNS-ével is reagálni (lásd 15. táblázat). Ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy a még nem szekvenált *Aspergillus lentulus* genom is tartalmaz *facC* ortológ gén(ek)e)t.

Kezdeti lépésként az *Aspergillus fumigatus* AFUA\_3G14910, ill. AFUA\_5G00540 gének teljes amplifikációjához primereket terveztünk (7., 8. ábrák) és *Aspergillus fumigatus* Af293 törzsének gDNS-én optimalizáltuk a gének amplifikációjához szükséges reakció körülményeket.

Gradiens PCR reakciókat végeztünk (Thermo Hybaid Px2 PCR Express Thermal Cycler), melyek során a *Phusion® High-Fidelity* DNS polimeráz enzimet (F-530S, Lot: 1137) használtuk, 1U/20 µL végkoncentrációban. Az 5x *Phusion HF* puffer (F-518) koncentrációja 4 µL/20 µL, a dNTP mix reakcióterbeni anyagmennyisége pedig 200 µM volt. A PCR reakció körülményeit a 6. táblázat-ban tüntettük fel.

	Hőfok	Időtartam	A gradiens PCR platform
1.	92 °C	5 min	Megnövelt időtartamú denaturációs fázis
2.	92 °C	1 min, 15 sec	Denaturáció
3.	55 °C 60 °C 65 °C	1 min, 15 sec	Anelláció
4.	72 °C	1 min, 15 sec	Extenzió
.....			
2-4 lépések ismétlése 35x			
5.	4 °C	további felhasználásig	Végső fázis

**6. táblázat. Gradiens PCR protokoll az *Aspergillus lentulus* genomban feltételezett *Aspergillus fumigatus* AFUA\_3G14910, ill. AFUA\_5G00540 génekkel nagyfokban homológ *Aspergillus lentulus* gén amplifikációjához.**

A használt PCR készülék: gradiens PCR, BioScience, Px2

### *Aspergillus fumigatus* AFUA\_3G14910

```
5' -ATGACTCCGCTCGTCAAAGTCGGCAGC-3'  
ATGACTCCGCTCGTCAAAGTCGGCAGCCTTCTGGCCGATTGCTCTGGGTACCTTTGGC  
ATCGCGACAGTCAGCGCCAGCATCCCCTCATCCAAACGCTTCGATCTCTCTGCCCTCC  
GCCGACTCTTACCGTCACAAAGCCCTCCGCGATGACACAGTCCAGCAAGGATTCGCCTTT  
GACAATGTCAACCGCCGCTTTTCGTGCGCCAGCGCCGCGACGGCTCCTCCGAAACAGCG  
GGCGACCTAACAATCACCCAGCTCGACTTTGACGGCAACTACGTCCGACACATGTACCTA  
AAGAGCTTTGGTTCATGGCGTCTCCTTCGGCGCGCAGCCGTTGGGTCCGCAACCTACCTC  
TGGACCGAGGTGACGCGCAACGCCAACGGCTACGGCAAGCAACTCGCCCGCTTCAAGTTC  
GCCTCGGGCACCACGCTGACCAGCTCCTCCGCTCAACTGGCAAAGTTCAAGCCCGTCGCC  
GACGCAACGGAGCATAACCTGCGCCATTGACCCGGTGTACAACCGGCTGATCGTCCGGTAT  
CACCTCAGCGGGTCAAAGCATATCGCCGTGTATGATCTTGCTGCGGCGACGCGCGCGAT  
TTCTCCGCCCCGCTGGCGAAGTTCAGCAGCCGGAGTTGGAGACGCTGTCGTTGACTTTC  
CAGGGTTATGCAGCGTATGGACAGTATCTGTATCTGCTGACGGGAAGTTCATATGCGGCC  
AGCGGAGGTAAAGTCAATTCCGAGGTAACCAGTGTGACATGAACACGGGCAAGGTGGTG  
CAGGGGCCACGCTCACCAAGCCGGTTCACGCTGGAGTTTAGAGAGCCGGAGGGGATTA  
GCGATTTACAAGACGGCTGCGGGCAGGTGAGGTTGTTCTTGGGTTGCTTCGGGGAAG  
CGGGTGATCGCAGGTGAACTCTGTTCTACAAGAATGTGTTGGTTTAG  
3' -GACAAGATGTTCTTACACAACCAAATC-5'
```

7. ábra. *Aspergillus fumigatus* Af293 AFUA\_3G14910 *facC* ortológ gén 948 bp hosszú szekvenciája.

Az ábrán késsel jelöljük az *Aspergillus fumigatus facC* ortológok amplifikációjához használt primerek szekvenciáit. Forward primer szekvenciája, 5'-ATGACTCCGCTCGTCAAAGTCGGCAG-3', 27 mer. Reverse primer szekvenciája: 5'-CTAAACCAACACATTGTAGAACAG-3', 27 mer. Piros szín jelzi a későbbiek során HRM analízishez használt primereink tapadási helyeit, ill. ugyancsak piros színnel jelöltük az amplitonon azon nukleotidjait, amelyek a HRM analízisek olvadáspont különbségeinek alapjául szolgálnak majd.

### *Aspergillus fumigatus* AFUA\_5G00540

```
5' -ATGCGAGTCTCCCTCTTTGCTATCAT-3'  
ATGCGAGTCTCCCTCTTTGCTATCATCACAGCACTAACATGTGTGATTGCCAAAATCCCC  
GACTCTCCACGATTCGACCTCACCAACCGTCGTATGACCTCTGGCGGAACAAGAAAACC  
GCCGCCAAAACCGTCCAACAGTCATTCACCTTTGACAACGTCAACCGCCGCTGTTCATC  
GTAACCGTCCGCGATGGCTCCGCCCTCGACTCAGGAGACTTGACAATCAGCCAACTCGAC  
TTCTCCGGAAAGGTCCTCGGCTCAATGCACCTGCTCGGCTGCGGCCACGGTGTGAACATC  
GCCGCGGAACCAATCGGAAGCGATACGTATATCTGGAGTGAAACCGACGCTGCAGCCAGC  
GGATACGGGACAGCATTTGTGGAAGTTCAAGTTCAGAAATGGCAAGACGTTGAATAGCGCC  
ACGGATAAGCGCAAGCGGATTTGTCCGTTGCCGAGTTTGACAGGGGCACTGCCACAATT  
GACCCCGTTTATAAGCGGTTGATCGTGCGATACCAGACGGGACCGTGCAGAATCAGCC  
GCGTTTGACCTTGCTGAGGCGAGCGCAGGCAATTTTTCGAACCCACTGGCCAAATGGGAG  
ATTCCGCATCTCGTCAAGGAGCTCGGGGCAAAGTTAACGTCTTTCAGGGATATACAGCT  
TACGGGCGGTATGTCTATTTCTGACTGGGGAATCTTATGACGCTAGTGGTGGTAAAGCTG  
AATTCAGAGGTTATGGCTCTGGACTTGAATACTGGGAAGCTTGTGCAAGGGCCTGTCAAC  
ACAAAGGCGGGTTCGACGTTGAAATTTCTGAGCCGGAGGGGATGGCAATCTATAAGACG  
GCCAGTGGGAGGTGAGGCTTTCTTGGGATTCCGCTCGGGGTTGCAGGAGACCGGAGG  
AGTAATCTGTTTTACAAGAACGCGCTGATATAG  
3' -CAAAATGTTCTTGCAGGACTATATC-5'
```

8. ábra. *Aspergillus fumigatus* Af293 AFUA\_5G00540 *facC* ortológ gén 933 bp hosszú szekvenciája.

Az ábrán késsel jelöltük az *Aspergillus fumigatus facC* ortológok amplifikációjához használt primerek szekvenciáit. A forward primer szekvenciája: 5'-ATGCGAGTCTCCCTCTTTGCTATCAT-3', 26 mer. A reverse primer szekvenciája: 5'-CTATATCAGCGGTTCTTGTAAG-3', 25 mer.

Terveink szerint az amplifikációt követően a kapott fragmenteket szándékunkban állt megszekvenáltatni a HRM rendszereink megtervezéséhez, így kiemelkedő fontossággal bírt a felsokszorozott szekvenciák pontossága. Az 5'-3' elongációs és 3'-5' exonukleáz aktivitással is egyaránt rendelkező *Phusion* polimeráz enzim  $4,4 \times 10^7$  nukleotidonként hibázik egyszer, amely 50-szer kevesebb, mint a Taq DNS polimerázé (*Thermus aquaticus*) és 6-szor jobb a Pfu DNS polimerázétól (*Pyrococcus furiosus*) is, így ezt használtuk.

Az PCR amplifikáció eredményeinek kiértékeléséhez agaróz gélelektroforézist végeztünk. A 2%-os agaróz géleket ethidium bromiddal (EtBr) festettük. A DNS fragmentek méretének pontos meghatározásához és azonosításához 100 bp-os molekulasúly markert használtunk.

Az *Aspergillus fumigatus* AFUA\_3G14910-génhez tartozó, primerpárral sikeresen amplifikált *Aspergillus lentulus* nukleinsav fragmenteket megszekvenáltattuk, majd megterveztük a [7. ábrán](#) bemutatott, *Aspergillus fumigatus* Af293 *facC* ortológ (AFUA\_3G14910), és az *Asperillus lentulus* SZMC3118 törzs *facC* ortológ génekhez egyaránt hibridizáló, előre (forward) ill. hátramutató (reverse) PCR primereket. Ezeket a továbbiakban az *Aspergillus fumigatus*, ill. *Aspergillus lentulus* fajok amplikonjainak a jellemző szekvencia eltéréseiből adódó olvadáspontjaik, és leolvadási görbéik (HRM analízis) alapján történő azonosítására használtuk.

### 5.5.1 *Aspergillus fumigatus* és *Aspergillus lentulus* HRM esszé dinamikus tartományának mérése gDNS paneleken

A real-time futásokat a *Roche LightCycler® 96 Instrument* készüléken végeztük. Festék: *ResoLight dye* (Roche). Assay Mix: *2x LightCycler® 480 High Resolution Melting Master* (Cat. No. 04 909 631 001). A legújabb generációs, aspecifikus fluoreszcens festékek, mint pl. amilyen a *ResoLight Dye* (Roche Applied Science) vagy *EvaGreen®* a duplaszálú DNS-hez interkalálódnak, nem toxikusak a polimeráz enzim számára, ezért magas koncentrációban alkalmazhatóak, így gyakorlatilag közel teljes szaturációt biztosítanak. Ezért is alkalmasak magas felbontóképességű, HRM (high resolution melting) olvadási görbe analízisre. Az assay használata során a protokolban javasoltak szerint jártunk el, és az olvadáspont analíziseinket 20 µl reakció térfogatban, 3 mM MgCl<sub>2</sub> koncentráció mellett, 96-os well-plate-en futtattuk. A templát térfogata 6,6 µl. A 7. táblázatban feltüntetett módon *Aspergillus fumigatus* AF293 ill. *Aspergillus lentulus* SZMC3118 genomi DNS tartalmú paneleket (HRM panel-1, HRM panel-2, HRM panel-3) készítettünk 7 log<sub>10</sub> tartományban (10<sup>6</sup>-1 GE/PCR reakció).

**7. táblázat.** *Aspergillus fumigatus* Af293 ill. *Aspergillus lentulus* 3118 nukleinsav tartalmú panelek a HRM esszék amplifikációs hatékonyságának (efficiency), és LoD értékeinek meghatározásához.

Panel neve		HRM panel-1	HRM panel-2	HRM panel-3	
gDNS tartalma		<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	<i>Aspergillus lentulus</i> 3118	<i>Aspergillus fumigatus</i> és <i>Aspergillus lentulus</i>	
GE/20uL	log10 GE/20 uL	DNS koncentráció	DNS koncentráció	DNS koncentráció	
10 <sup>6</sup>	6	15 ng	15 ng	7,5 ng	7,5 ng
10 <sup>5</sup>	5	1,5 ng	1,5 ng	0,75 ng	0,75 ng
10 <sup>4</sup>	4	150 pg	150 pg	75 pg	75 pg
10 <sup>3</sup>	3	15 pg	15 pg	7,5 pg	7,5 pg
10 <sup>2</sup>	2	1,5 pg	1,5 pg	0,75 pg	0,75 pg
10	1	150 fg	150 fg	75 fg	75 fg
1	0	15 fg	15 fg	7,5 fg	7,5 fg

Az *Aspergillus fumigatus* Af293 és az *Aspergillus lentulus* SZMC3118 specifikus HRM esszét az *Aspergillus fumigatus* gDNS tartalmú panel-1-en, ill. az *Aspergillus lentulus* SZMC3118 gDNS tartalmú panel-2-n teszteltük. A panel-3 egyaránt tartalmazott *Aspergillus fumigatus* Af293 ill. *Aspergillus lentulus* SZMC3118 gDNS-eket a táblázatban feltüntetett koncentrációkban (1:1 arányban), így ezt a panelt az *Aspergillus fumigatus* ill. *Aspergillus lentulus* specifikus HRM esszéink 1:1 arányú keverékével vizsgáltuk.

## 5.6 Taqman® esszék dinamikus tartományának mérése *Aspergillus* konídium tartalmú biológiai paneleken

### 5.6.1 Extrakciós és amplifikációs kontrollok

Azon, egészséges kontrolloktól származó vérmintákat (szérum, ill. teljes vér), amelyeket a továbbiakban különböző negatív (*Aspergillus* konídiumokat és nukleinsavakat sem tartalmazó minták), ill. pozitív kontrollként (*Aspergillus* konídiumokat meghatározott mennyiségben tartalmazó minták) terveztünk használni egybeöntöttük (pool-oztuk) és felhasználás előtt minden esetben ellenőriztük azok, ill. ezzel együtt az izoláláshoz használt reagensek tisztaságát.

Amennyiben a reagensek és a kontrolloknak szánt minták negatívnak bizonyultak, biztonsággal alkalmazhattuk őket további célokra. A továbbiakban ezeket a mintákat használtuk mind az ECN, mind pedig a különböző *Aspergillus* konídium tartalmú biológiai panelek (lásd alább, 5.12.2 fejezet 7., 8. táblázat) elkészítéséhez.

- ❖ **ECN** (negatív extrakciós kontroll): negatív biológiai minta, amely sem konídiumot, sem nukleinsavat nem tartalmaz.
- ❖ **LCN** (negatív lízis kontroll): gomba nukleinsav, ill. konídium mentes lízis kontroll a mechanikus feltárás során fellépő esetleges kontamináció ellenőrzésére.
- ❖ **PCR-IC** (PCR inhibíciós kontroll): real-time analízisek gDNS ( $10^2$ - $10^3$  GE) tartalmú inhibíciós kontrollja.
- ❖ **PCR-NTC** (PCR non-templát kontroll): nukleáz mentes vizet tartalmazó, amplifikációs reakció, a real-time reagensek tisztaságának ellenőrzésére.

### 5.6.2 Konídium tartalmú biológiai panelek

A biológiai minták (kontroll és panel minták egyaránt) nukleinsav extrakciója Roche MagNA Pure LC 2.0 automata nukleinsav izoláló rendszerben folyt. A real-time PCR analíziseket a Taqman®-MGB esszék esetén *LightCycler 7500 Real-time PCR Systems*, míg a Taqman®-LNA esszék esetén *Roche Light Cycler 2.0 kapilláris PCR* készülékeken végeztük.

- ❖ **Hat-tagú teljes vér paneleket készítettünk Taqman®-MGB (Taqman®-MGB3, Taqman®-MGB4), ill. Taqman®-LNA (Taqman®-LNA3, Taqman®-LNA4) esszéink dinamikus tartományainak meghatározásához.**

Egészséges kontrolloktól származó teljes vérmintákhoz (2,5 ml)  $2,5 \times 10^6$  CFU-nak megfelelő mennyiségű *Aspergillus fumigatus* AF293 és *Aspergillus terreus* NCCB IH2624 konídiumot mértünk, majd ezekből 6 tagú, 10x-es ( $10^6$ - $10^1$  CFU) hígítási sorokat (panelek) készítettünk (8. táblázat). A kétfelé mért mintákat (1,25 ml) a mechanikai lízist követően párhuzamosan vizsgáltuk *Aspergillus fumigatus* (Taqman®-MGB3, Taqman®-LNA3) ill. *Aspergillus terreus* (Taqman®-MGB4, Taqman®-LNA4) specifikus esszéinkkel.

**8. táblázat. Taqman®-MGB, ill. Taqman®-LNA esszék dinamikus tartományainak meghatározásához használt teljes vér panelek.**

Teljes vér		Lizátumok		Teljes vér panel-1	Teljes vér panel-2
CFU/2,5 ml	CFU/1,25 ml	GE/1 ml	$\log_{10}$ GE/1 ml	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293 gDNS	<i>Aspergillus terreus</i> IH2624 gDNS
$2,5 \times 10^6$	$1,25 \times 10^6$	$10^6$	6	15 ng	15 ng
$2,5 \times 10^5$	$1,25 \times 10^5$	$10^5$	5	1,5 ng	1,5 ng
$2,5 \times 10^4$	$1,25 \times 10^4$	$10^4$	4	150 pg	150 pg
$2,5 \times 10^3$	$1,25 \times 10^3$	$10^3$	3	15 pg	15 pg
$2,5 \times 10^2$	$1,25 \times 10^2$	$10^2$	2	1,5 pg	1,5 pg
$2,5 \times 10^1$	$1,25 \times 10^1$	$10^1$	1	150 fg	150 fg

- ❖ **Öt-tagú, nagyszámú szérum paneleken Taqman®-LNA (Taqman®-LNA3, Taqman®-LNA4) esszéinket (184 db *Aspergillus fumigatus* vagy *Aspergillus terreus* minta) tovább teszteltük.**

Egészséges kontrolloktól származó, *Aspergillus fumigatus* AF293 (128 db szérum minta) és *Aspergillus terreus* IH2624 (56 db szérum minta) konídiumot meghatározott mennyiségben tartalmazó, egyenként 2 ml térfogatú **szérum paneleket (16 db *Aspergillus fumigatus* Af293 és 7 db *Aspergillus terreus* IH2624 panel)** készítettünk elő ( $10^5$ - $10^1$  CFU tartományban) a 9. táblázat-ban bemutatottak alapján, majd a mintákat nyolcfelé mértük (250  $\mu$ l) és a bennük lévő *Aspergillus* gomba konídiumot mechanikus lízissel tártuk fel.

**9. táblázat. *Aspergillus fumigatus* Af293, ill. *Aspergillus terreus* IH2624 szérumban gomba konídium tartalmának alakulása és összetétele, ill. a nyers pozitív/negatív eredmények panelenkénti megoszlása a biológiai minták pozitívításának, ill. negatívításának feltűntetése nélkül.**

Szérumban panelek (db)	Minta szám (db)	Panel	Lízis minta	Szérumban	Elútumban	PCR reakció
		CFU/2 ml	CFU/250 µl	GE/200 µl	GE/60 µl	GE/20 µl
3 LNA3 2 LNA4	24 16	80 000	10 000	8000	8000	1066,7
5 LNA3 1 LNA4	40 8	2528	316	253	253	33,8
4 LNA3 2 LNA4	32 16	800	100	80	80	10,7
2 LNA3 1 LNA4	16 8	256	32	26	26	3,3
2 LNA3 1 LNA4	16 8	80	10	8	8	1,1

**A panelekkel megegyező számú negatív kontroll szérumbanok (184 db ECN kontroll) analízise folyt.** Az ECN minták 5%-nál magasabb fals pozitívítása esetén kapott eredményeink nem kerültek kiértékelésre. Míg a  $10^4$  genomnak megfelelő mennyiségű (*Aspergillus fumigatus* ill. *Aspergillus terreus*) gomba nukleinsav tartalmú pozitív minták esetében, a magas templát koncentrációra való tekintettel csak két párhuzamos PCR reakciót végeztünk, addig az ECN ellenőrzött minták esetében minden esetben három párhuzamot futtattunk. A további real-time analízisek során kivétel nélkül három párhuzamos PCR reakciót végeztünk és csak abban az esetben tekintettünk adott mintát negatívnak, amennyiben a három futás közül egyetlen PCR amplifikáció sem mutatott pozitív eredményt.

### 5.6.3 Mechanikai lízis Roche MagNA Lyser berendezéssel

A gomba konídiumokat MagNA Lyser (Roche Applied Science) készüléssel és kerámia gyöngyök (Ceramic Green Beads, Roche Applied Science) alkalmazásával, általunk optimalizált protokollnak megfelelően (90 sec, 5000 rpm) tártuk fel a további felhasználásnak megfelelően 250 µl ill 1250 µl-ben.

### 5.6.4 Nukleinsav izolálás Roche MagNA Pure LC 2.0 nukleinsav izoláló berendezéssel

A Roche MagNA Pure LC 2.0 automata nukleinsav izoláló berendezés gyors, pontos és hatékony munkát tesz lehetővé. Beépített HEPA filterrel és UV lámpával rendelkezik. Gondosan beállított rendszerelőkészítő protokoll (Greasing station program futtatása <sup>16</sup>) szigorú betartása mellett tiszta munka feltételei teremthetőek meg.

Az izolálási protokollokhoz a Roche cég által forgalmazott Roche MagNA Pure LC - *Total Nucleic Acid Isolation Kit* ill. a *MagNA Pure LC Nucleic Acid Isolation Kit – High Performance* kit-eket használtuk. Előbbi 1000 µl-ből, míg az utóbbi 200 µl-ből képes nukleinsavat izolálni. Így az 1250 µL lizátumból 1000 µL-t, míg a 250 µl lizátumból 200 µl-t mérünk be sterilen, elszívó fülke alatt a mintatartó tégelyekbe. 1000 µl reakcióterefogat esetén a választott protokoll a *Total NA LV Serum\_Plasma.blk* volt, s a megfelelő oldatok mennyisége, a processzálo edények jellege a protokollban megszabottak szerint alakult. Az elútum 50 µL térfogatú volt. A *Total NA Variable Elution Volume.blk* program során a gépbe töltött biológiai minták térfogata 200 µl, míg az elúciós térfogat 60 µl-volt.

### 5.6.5 Poszt-elúció

A Taqman®-MGB3 ill. Taqman®-MGB4 kondíciójú real-time PCR amplifikációk az Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR készüléken, míg a Taqman®-LNA3 ill. Taqman®-LNA4 kondíciójú real-time analízisek a Roche LightCycler®480 Instrument II készüléken futottak 20 µl reakció térfogatban és megfelelő PCR-IC, ill. PCR-NTC kontrollok beiktatása mellett.

---

<sup>16</sup> Greasing station = az “O-ringek” (gumigyűrűk, amelyekre a pipetták hermetikusan tapadnak) zsírozása (szilikonozása).

## 5.7 A 2014-es ISHAM-EAPCRI BAL panelek

2014 novemberében, az ISHAM-EAPCRI nemzetközi szervezet, mostanra már 27 tagot számloló kutató szervezet tagjaként, mi is megkaptuk a 2014-es év körkörös vak BAL paneljeit (BAL panel-D1 és panel-D2) vizsgálatra, amelynek az összetételét a 10. táblázat mutatja.

10. táblázat. A 2014-es vak BAL panelek (BAL panel-D1 és BAL panel-D2) összetétele.

Minta ID	<i>Aspergillus fumigatus</i> target jellege	DNS /500 µl BAL	Szórás 95% CI	Detektálás fontossága
1	Negatív kontroll	0 GE	0	Alapvető fontosságú
2	<i>Aspergillus fumigatus</i> DNS	50 GE	36-64	Alapvető fontosságú
3	<i>Aspergillus fumigatus</i> DNS	10 GE	3,7-16,3	Alapvető fontosságú
4	<i>Aspergillus fumigatus</i> DNS	5 GE	0,6-9,4	Lényeges
5	<i>Aspergillus fumigatus</i> DNS	1 GE	-1,0-3,0	Lényeges
6	<i>Aspergillus fumigatus</i> DNS	100 GE	80,2-119,8	Alapvető fontosságú
7	<i>Aspergillus fumigatus</i> konídium	5 GE	0,6-9,4	Lényeges
8	<i>Aspergillus fumigatus</i> konídium	50 GE	36-64	Alapvető fontosságú
9	<i>Aspergillus fumigatus</i> konídium	1 GE	-1,0-3,0	Lényeges
10	<i>Aspergillus fumigatus</i> konídium	10 GE	3,7-16,3	Alapvető fontosságú
11	<i>Aspergillus fumigatus</i> konídium	100 GE	80,2-119,8	Alapvető fontosságú
12	Negatív kontroll	0 GE GE	0	Alapvető fontosságú

A nukleinsav izolálás hatékonyságának, ill. a különböző *home-made* real-time PCR *Aspergillus* diagnosztikai módszerek analitikai szenzitivitásának meghatározásához tengerimalac BAL mintákat készítettek elő feldolgozásra a cardiffi központ mikrobiológiai laboratóriumában (Public Health Wales, Microbiology). A BAL mintákat összeöntötték és ellenőrizték, hogy valóban nem tartalmaznak *Aspergillus fumigatus* eredetű nukleinsavakat vagy konídiumokat. A panelek 12x500 µl tengerimalac BAL mintát tartalmaztak *Aspergillus fumigatus* gDNS (1-6 minták) ill. konídiumainak különböző koncentrációival (7-12 minták). A panelek pontos összetétele azok feldolgozásukat megelőzően egyetlen résztvevő centrum számára sem volt ismert.

Két azonos BAL panel (BAL panel-D1, BAL panel-D2) érkezett hozzánk feldolgozásra, melyek közül az egyikből automata rendszerben, míg a másikkól manuális nukleinsav izoláló módszerrel nyertük ki az *Aspergillus fumigatus* eredetű gomba nukleinsavakat. Minden egyes minta esetében mechanikus lízist végeztünk a mintákban lévő konídiumok feltárására.

A két panelt 2 különböző real-time rendszerben vizsgáltuk (Roche LC 2.0, LC 96). Összesen 4 módszert (módszer-1,-2,-3,-4) teszteltünk a 11. táblázat-ban leírtak alapján.

**11. táblázat. 2014-es BAL panelek feldolgozásának módszerei legfontosabb jellemzőikkel.**

Mintafeldolgozás stációi	A		B		C		D		E		F		
	BAL panel		Minta- térfogat		Mechanikai lízis		Nukleinsav extrakció		Elúció		Real-time PCR		
	D1	D2	250 µl	500 µl	Lízis A	Lízis B	Automata	Manuális	60 µl	45 µl	LC 2.0	LC 96	IC
<b>Módszer-1</b>	<b>x</b>		<b>x</b>		<b>x</b>		<b>x</b>		<b>x</b>		<b>x</b>		<b>x</b>
<b>Módszer-2</b>	<b>x</b>		<b>x</b>		<b>x</b>		<b>x</b>		<b>x</b>		<b>x</b>		<b>x</b>
<b>Módszer-3</b>	<b>x</b>		<b>x</b>			<b>x</b>	<b>x</b>		<b>x</b>		<b>x</b>		<b>x</b>
<b>Módszer-4</b>		<b>x</b>		<b>x</b>	<b>x</b>			<b>x</b>		<b>x</b>	<b>x</b>		<b>x</b>

Az első három módszer esetében (módszerek-1,-2, ill.-3) az első BAL panelt (**BAL panel-D1**), míg a módszer-4 esetében a 2. panelt (**BAL panel-D2**) vizsgáltuk *Aspergillus fumigatus* specifikus konidiumok, ill. nukleinsav targetek jelenlétére.

- ❖ **A, Mintatérfogat**: A vak **BAL panel-D1** esetében az 500 µl BAL mintákat két részletben (2 x 250 µl) lizáltuk és a lizátum 2/5-ét (200 µl) töltöttük be a MagNA Pure LC 2.0 (Roche Applied Science) nukleinsav izoláló automata mintatartó tégelyébe II-es biztonsági fokozatú, steril elszívó fülke alatt. A vak **BAL panel-D2** esetében a teljes mintatérfogatot (500 µl) lizáltuk és a lizátumból (450-460 µl) izoláltunk *Aspergillus fumigatus* nukleinsavat manuális rendszerben.
- ❖ **B, Mechanikai lízis**: **Módszer-1,-2,-4** esetében a **kerámiagyöngyös lízist alkalmaztuk**, 20-25 gyöngy/reagens cső, 5000g, 40 sec (lízis A). **Módszer-3** esetében a **Roche SeptiFast Lysis Kit-et** (04 404 432 001) **használtuk**, s a protokollban leírtak szerint (7000g, 70 sec) jártunk el (lízis B).
- ❖ **C, Nukleinsav extrakció**: Az **automata** rendszerű **izoláláshoz** a Roche MagNa Pure LC Nucleic Acid - High Performance (05 323 738 001) kitet használtuk. A nukleinsav extrakció a Total NA Variable Elution Volume.blk protokollnak megfelelően zajlott. Futási protokollnak a “*Variable Elution Volume*”-ot jelöltük meg. A **manuális** rendszerű **nukleinsav extrakcióhoz** a Roche High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume (05 114 403 001) kitet használtuk a protokollban megjelölt utasításoknak megfelelően.

- ❖ **D, Elúciós térfogatok**: Automata rendszerű nukleinsav extrakciót követően **60 µl-ben** (a protokolban meghatározottak szerint) **eluáltunk**, míg a manuális rendszerben **45 µl-ben**.
- ❖ **E, Real-time PCR**: *Aspergillus fumigatus* specifikus **Taqman®-LNA3** esszét használtunk. **Roche LC 2.0 real-time** futások során alkalmazott 5x Light Cycler Taqman Master-t (04 735 536 001) használtunk. A 20 µl **reakció térfogat 60%-a** (12 µl) **templát** (az elútum 26%-a) volt. **Roche LC 96 real-time** futások során 2x FastStart Essential Probes Master-t (06 402 682 001) használtunk. A 20 µl **reakció térfogat 40%-a** (8 µl) **templát** (az elútum 17%-a) volt.
- ❖ **F, IC kontroll**: **QuantiFast Pathogen PCR+IC Kit** (211352). A kítchez javasolt MasterMix nem kompatibilis az LC 2.0 real-time PCR üveg kapillárisaival (nem tartalmaz BSA-t), ezért az inhibíciós kontroll futások során is 5x Light Cycler Taqman Master-t (04 735 536 001) használtunk.

A pontozás menete a következőképpen alakult. Alapvető fontosságú minták ( $\geq 10$  CFU/GE, ill. 0 CFU/GE) helyes azonosításakor (negatív minták negativitása esetén) 3 pont, míg lényeges minta (<10 CFU/GE) detektálásakor 2 pont adódott az egyes panelek különböző módszerekkel történő feldolgozásával kapott adatsorainak pontjaihoz. Maximálisan adható pont 32 (24 pont alapvető fontosságú minták helyes azonosítására, míg 8 pont a lényeges minták azonosítására). *Aspergillus fumigatus* konídium, ill. *Aspergillus fumigatus* DNS detektálásával, maximálisan gyűjthető pontok száma 16 volt külön-külön.

## 6. BETEGEK és MÓDSZEREK

### 6.1 Betegpopuláció

2012. június 6. és 2013. május 8. közt eltelt 11 hónap során 27 (16 férfi, 11 nő), különböző hematológiai megbetegedésben (főként AML) szenvedő, őssejttranszplantált, intenzív kemoterápiás kezelés alatt álló, lázas neutropeniás (neutrofil szám  $< 0,5 \times 10^9$  sejt/liter; testhőmérséklet  $> 38^\circ\text{C}$  két alkalommal mérve  $> 38,5^\circ\text{C}$  egyszer mérve) beteg (LNE) került bevonásra prospektív eset-kontroll tanulmányunkba a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Intézet beteganyagából (12. táblázat).

12. táblázat. Lázas neutropeniás epizódok demográfiai mutatói.

	Érték(ek)
Lázas neutropeniás betegek száma	27
Antibiotikum kúrára nem reagáló lázas betegek (I. csoport)	16
Antibiotikum hatására láztalanná vált betegek (II. csoport)	11
Férfi/nő nemek aránya	1 : 0,69
Férfiak median életkor (év) $\pm$ (tartomány)	42.5 (14-75)
Férfiak átlagéletkora (év) $\pm$ (SD)	39,31 $\pm$ 21.72
Nők median életkor (év) $\pm$ (tartomány)	45.5 (19-66)
Nők átlagéletkora (év) $\pm$ (SD)	43,50 $\pm$ 15.31
AML epizód, (%)	10 (37%)
ALL epizód, (%)	2 (7%)
HL epizód, (%)	1 (3,7%)
NHL epizód, (%)	3 (11%)
MM epizód, (%)	2 (7%)
PTCL epizód, (%)	1 (3,7%)
EM egyéb malignitások, (%)	8 (30%)

Rövidítések: (AML), Akut Myeloid Leukémia; (ALL), Akut Limfoblasztos Leukémia; (HL), Hodgkin Limfóma; (NHL), Non-Hodgkin Limfóma; (MM), Mielóma Multiplex; (PTCL), Perifériás T-sejtes Limfóma; (EM), egyéb malignitások.

## 6.2 Eset csoport, kontroll csoport

Egy új, *in vitro* diagnosztikában még nem alkalmazott módszer, (esetünkben a *facC*-PCR) validálásához és így a szükséges statisztikai mutatók megfelelő kalkulációjához elengedhetetlen, hogy a módszer által generált eredmények megbízhatóságát ellenőrizzük.

Ehhez a klinikus szakemberek a lázas neutropeniás epizódokat az invazív tüdőaszpergillózis (ITA) szempontjából különböző veszélyességi csoportokba (bizonyított ITA, valószínű ITA, nem bizonyítható ITA) sorolják az EORTC-MSG által definiált irányelveknek megfelelően, objektív klinikai, mikrobiológiai (tenyésztés, hemokultúrák, BAL), képalkotó (mellkas CT) és molekuláris (GM szerológia) vizsgálatok eredményeinek figyelembe vételével (De Pauw és mtsai, 2008).

A klinikai gyakorlatban megszokottak analógiájára, a „bizonyított ITA és valószínű ITA” kategóriába sorolt epizódok képezték az eset csoportunkat, míg a „nem bizonyítható ITA” kategóriába soroltak a kontroll csoportot (Springer és mtsai, 2013).

## 6.3 Az invazív tüdő aszpergillózis diagnosztikai stratégiája

A láz megjelenését követően a betegek valamilyen (pl. *cefepime* vagy *carbapenem*) széles spektrumú antibiotikum kezelést kaptak az aktuális IDSA (Infectious Diseases Society of America) irányelveknek megfelelően (Freifeld és mtsai, 2011).

### 6.3.1 Képalkotó vizsgálatok

A lázas neutropénia megjelenését követően minden vizsgálatba bevont betegről készült mellkas CT (komputer tomográfia) felvétel.

### 6.3.2 Biológiai marker-monitorozás

Diagnosztikai stratégiánk részeként kombinált biomarker monitorozást végeztünk invazív tüdő aszpergillózis (ITA) detektálására. Lázas neutropeniás betegek szérum mintáit monitoroztuk különböző biológiai target molekulák (GM antigén ill. *facC* ortológ génszakaszok) jelenlétére Platelia *Aspergillus* GM-EIA szerológia (300 µl) és *facC*-PCR (1 ml-2,5 ml) módszerekkel (9. ábra).

A betegek vérmintái (3 darab) sárga kupakos, gélszeparátoros csövekbe kerültek levételre, és a Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetébe érkeztek a vizsgálatkérő lapokkal együtt. A DNS analízisre szánt (2 darab), bontatlan szérum csövek a Humánngenetikai Tanszékre kerültek átszállításra.

- ❖ Szerodiagnózis. Az *Aspergillus* GM-EIA vizsgálatok a Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetének Vírus laboratóriumában folytak, ahol sandwich ELISA (Platelia *Aspergillus* GM-EIA; Bio-Rad Laboratories, Magyarország) tesztet használtak a GM detektálásához szérum mintákból. GM-EIA eredmények kiértékelését az  $OD_{450/620} \geq 0.5$  pozitívítási cut-off index figyelembe vétele mellett, az előírtaknak megfelelően végezték.
- ❖ facC-PCR alapú nukleinsav detektálás. A GM szerológiával párhuzamosan, a nukleinsav alapú diagnózis az általunk optimalizált *C faktor* ortológ gének detektálásán alapuló *facC*-PCR esszénkkel a Humánngenetika Tanszéken történt. 2,5 ml vérből izoláltunk DNS-t steril, II. biztonsági fokozatú lamináris fülke alatt. A nukleinsav kinyerést a *High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit* (Roche Applied Science) által megszabott protokollban leírtak szerint végeztük a megfelelő pozitív; *QuantiFast Pathogen PCR+IC Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) ill. ECN (egészséges kontrolloktól származó szérum minták) kontrollok beiktatása mellett. Az eluálást 45 µl-ben végeztük. A PCR amplifikáció során 12 µl elútumot monitoroztunk *Aspergillus fumigatus* nukleinsav jelenlétére a Taqman®-LNA3 esszénkkel, 20 µl üveg kapillárisokban, LightCycler 2.0 platform-on (Roche Applied Science), *5x LightCycler Taqman Master* (Roche Applied Science) protokollában leírtaknak megfelelően. Három párhuzamos PCR reakciót végeztünk biológiai mintánként. Mivel az elútumot teljes térfogatában analizáltuk, ezért abban az esetben, ha az elútum tartalmazott gomba nukleinsavat, akkor azok jelenlétét ki tudtuk mutatni a *facC*-PCR real-time rendszerrel. Megfelelő negatív kontrollok beiktatása mellett, már egyetlen pozitív PCR reakció-esetén pozitívnak értékeltük az adott biológiai mintát.

### Mintavétel indikációja: lázas neutropénia

Beteg neve: \_\_\_\_\_ Szül. dátuma: \_\_\_\_\_ Taj száma: \_\_\_\_\_

0. h.: 3 x 5 mL szérum

3 cső szérum feladva, egy csomagban,  
Mikrobiológia felirattal az IVDI épületbe.

MedSol-kód: **MBVSZERO**

Vizsgálatkérő lapon **Aspergillus antigen X-el jelölve**

2012.\_\_\_\_.



---

Következő nap reggel 3 x 5 mL Szérum

3 cső szérum feladva, egy csomagban,  
Mikrobiológia felirattal az IVDI épületbe.

**\*A mintákat kérjük a 0-órás kéréssel együtt feladva küldeni!**

2012.\_\_\_\_.



---

Következő nap reggel 3 x 5 mL Szérum

3 cső szérum feladva, egy csomagban,  
Mikrobiológia felirattal az IVDI épületbe.

**\*A mintákat kérjük a 0-órás kéréssel együtt feladva küldeni!**

2012.\_\_\_\_.



---

**A továbbiakban, amíg a beteg osztályon fekvő:** 2 cső szérum mintavétele naponta. 2 cső szérum feladva, egy csomagban, Mikrobiológia felirattal az IVDI épületbe.  
\*A mintákat kérjük a 0-órás kéréssel együtt feladva küldeni!

**Minták átfutási ideje:**

**Szerológiai analízis:** hetente 2-szer. (H-K vagy SZ-CS).

**DNS analízis:** minden nap. Eredmények, 48 órán belül.

\*Így mindig csak a 0. órás Platelia teszt kerül számlázásra!

9. ábra. Kombinált biológiai marker monitorozás stratégiája invazív tüdőaszpergillózis szűrésére.

Ideális esetben adott lázas neutropéniás epizódhoz három *Aspergillus* GM-szerológia és három *facC*-PCR eredmény (3x3 real-time esszé) volt rendelhető. Akadtak epizódok, amelyek esetében kevesebb (2 darab) ill. amelyek esetében akár lényegesen több (18 darab) minta is érkezett a protokollban leírtakhoz képest (2. Függelék).

Annak ellenére, hogy nukleinsav alapú diagnosztikai eredményeink csak tájékoztató jelleggel szerepeltek és így nem kerültek figyelembe vételre sem a diagnosztikai, sem pedig a terápiás döntéshozatalban, a PCR eredményekről minden esetben értesítettük a klinikus és mikrobiológus szakembereket.

### 6.3.3 BAL analízis

Az invazív beavatkozást igényelő BAL elvégzésének az indikációját az alábbi körülmények jelentősen befolyásolták.

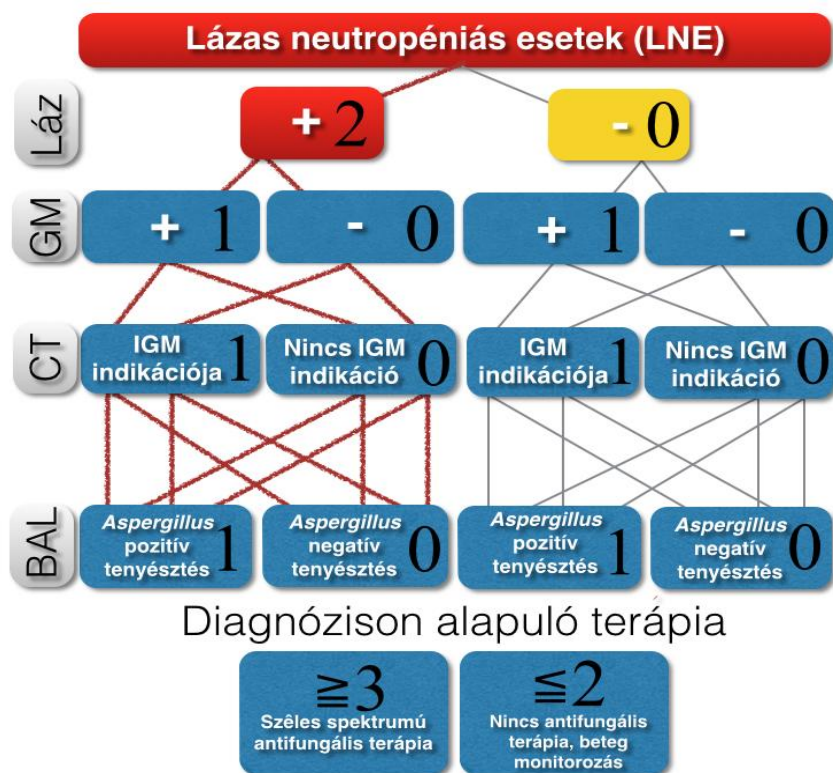
- ❖ megszűnt-e a láz a széles spektrumú antibiotikus kezelés hatására.
- ❖ meghaladta-e az elfogadott határértéket ( $OD_{450/620} \geq 0.5$ ) a GM antigén szintje a betegek szérumában akár egyetlen esetben is.
- ❖ kimutatott-e a mellkas röntgen a betegek tüdejében, invazív aszpergillózisra utaló képleteket („air crescent, halo-sign”).

### 6.3.4 Posztmortem hisztológia

A tüdő szövetében tenyésztő gombafonalak megjelenítésére alkalmas eljárás a hematoxylin-eosin (H&E) festés, azonban szöveti nekrozis esetén javasolt további kiegészítő festési eljárások alkalmazása (Denning és mtsai, 2003), mint pl. az ugyancsak gomba specifikus Grocott-Gömöri féle methenamine ezüsfestés (GMS) (Grocott, 1955), ill. a perjódsavas (Periodic acid-Schiff) festés (PAS). Szöveti mintákat a patológus kollégák a főbb testtájokról, ill. a tüdő parenchimának három jól elkülönülő területéről vettek és azokat gondosan vizsgálták jellegzetes, *Aspergillus* eredetű gombafonalak jelenlétére, amelyek esetében jól kivehetőek a szeptumos tagolódás és a hifaelágazódások.

## 6.4 Invazív tüdő aszpergillózis terápiás stratégiája

Több napon át tartó, széles spektrumú antibiotikum terápiára nem reagáló, esetleg visszatérő láz, egynél több (legoptimálisabb esetben két egymást követő) pozitív szerológiai eredmény, ill. pozitív CT és/vagy BAL tenyésztés együttes előfordulása alátámasztják az antifungális terápia megkezdésének fontosságát. A lázas állapot megszűnése, negatív CT és/vagy BAL tenyésztés esetén javasoljuk a kombinált, biomarker monitorozási periódus kiterjesztését heti kétszeri ellenőrzéssel.



10. ábra. Tüdő aszpergillózis javasolt diagnosztikai és terápiás stratégiájának részletes bemutatása.

Rövidítések: (LNE); lázas neutropéniás esetek, (GM); galaktomannán antigén detektálásán alapuló módszer, (CT); mellkas CT, (IM); invazív mikózis indikációja, (BAL); bronchoalveoláris lavázs tenyésztés. Az ábrán felülről lefelé haladva, prioritásuknak megfelelő sorrendben tüntettük fel a különböző vizsgálatokat, amelyeket lehetséges kimenetelüktől függően jelöltünk. Diagnózison alapuló terápia (angol terminológia szerint preemptive-terápia). Az egyes kék rubrikákon feketével jelölt számértékek összeadódnak, majd az így kapott végső érték segíti a klinikus szakembert a megfelelő terápiás döntés meghozatalában. Kettő, vagy annál alacsonyabb pontszámot elért epizódok esetén nem indikált az antifungális terápia, viszont ameddig a beteg osztályon fekszik, javasolt a nyomonkövetése. Ez utóbbi hetenként egyszeri-kétszeri alkalommal a PCR tesztek elvégzését, ill. pozitív PCR esetén a GM-szerológia elvégzését is jelenti. Három, vagy annál magasabb pontszámot kapott epizódok széles spektrumú antifungális kezelésben részesültek.

## 7. ADATELEMZÉS

### 7.1 Fontosabb statisztikai mutatók definiálása

(VP) **valós-pozitív** minták = patogén konídium, vagy DNS tartalmú, pozitív teszteredményt mutató minták, ill. esetektől származó, pozitív teszteredményt mutató minták. (ÁN) **ál-negatív** minták = patogén konídium vagy DNS tartalmú, negatív teszteredményt mutató minták, ill. esetektől származó, negatív teszteredményt mutató minták. (VN) **valós-negatív** minták = patogén konídium vagy DNS-t nem tartalmazó, minták, ill. kontrolloktól származó, negatív teszteredményt mutató minták. (ÁP) **ál-pozitív** minták = patogén konídium vagy DNS-t nem tartalmazó, minták, ill. kontrolloktól származó, pozitív teszteredményt mutató minták.

(Se) **szenzitivitás** = a pozitívnek helyesen felismertek aránya. (Sp) **specificitás** = a negatívak helyesen felismertek aránya. (PV<sup>+</sup>) **pozitív prediktív érték** arra utal, hogy pozitív minta esetén, mekkora az esély arra, hogy az adott minta valóban pozitív, ill. pozitív teszteredmény esetén, mennyi az esélye annak, hogy a vizsgált epizód valóban beteg. (PV<sup>-</sup>) **negatív prediktív érték** arra utal, hogy negatív teszteredmény esetén, mekkora az esély arra, hogy a vizsgált minta valóban negatív, ill. negatív teszteredmény esetén mekkora az esély arra, hogy a vizsgált epizód valóban nem beteg.

(LR<sup>+</sup>) = **likelihood ratio positive** annak a valószínűsége, hogy adott diagnosztikai teszt pozitív eredményt mutat egy betegségben szenvedő egyénnél, osztva annak a valószínűségével, hogy adott teszt pozitív eredményt mutat adott betegségben nem szenvedő egyénnél. (LR<sup>-</sup>) = **likelihood ratio negativ** annak a valószínűsége, hogy adott diagnosztikai teszt negatív eredményt mutat egy betegségben szenvedő egyénnél, osztva annak a valószínűségével, hogy adott teszt negatív eredményt mutat adott betegségben nem szenvedő egyénnél.

**DOR-esélyhányados.** A DOR (diagnostic odds ratio), azaz a diagnosztikai esélyhányados értéke azt mutatja meg, hogy pozitív teszteredmény esetén hányszorosára növekszik annak az esélye, hogy a beteg invazív aszpergillózisban szenved. Mivel a diagnosztikai OR értéke nincs maximálva, ezért ne lepődjünk meg, ha több nagyságrendnyi különbség mutatkozik az eltérő diagnosztikai platformok DOR értékeiben.

## 7.2 Statisztikai vizsgáló módszerek

Diagnosztikai tesztek esetében fontos szempont, hogy adott módszer ne generáljon fals (téves) eredményeket. A Bayes-féle megközelítés szerint a priori<sup>17</sup> és poszteriori<sup>18</sup> valószínűségek megfelelő kalkulációja segít a statisztikai mutatók helyes értelmezésében. A van-nincs azaz pozitív-negatív detektáláson alapuló tesztek kétváltozós, ún. dichotómikus teszteknek nevezzük. A statisztikai analízisekbe bevont epizódokat a vizsgált betegség szempontjából, aktuális egészségügyi státuszuknak megfelelően, két alpopulációra bontjuk. Esetekre és kontrollokra. Az eset-kontroll vizsgálatok eredményeit a 11. ábrán bemutatott 2x2-es kontingencia táblázat segítségével értelmezzük (11. ábra).

	Eset B+	Kontroll B-	
Pozitív teszt eredmény T+	VP, Valós pozitívok	ÁP, Ál pozitív	Pozitív prediktív érték $PV^+ = VP / (VP + \text{ÁP})$
Negatív teszt eredmény T-	ÁN, Ál negatív	VN, Valós negatívok	Negatív prediktív érték $PV^- = VN / (VN + \text{ÁN})$
	Szenzitivitás $Se$ $= VP / (VP + \text{ÁN})$	Specificitás $Sp$ $= VN / (\text{ÁP} + VN)$	a prediktív értékek függenek a PREVALENCIÁTÓL!

### 11. ábra. Prior és poszterior valószínűségek kalkulációja a Bayes-féle megközelítés alapján.

A dichotómikus tesztek valamely mérhető mutató alapján (T+, T-) vonnak le következtetéseket adott betegség meglétéről (B+) vagy hiányáról (B-).

A kategorikus (pozitív teszt/beteg, negatív teszt/beteg) és folytonos ( $Se$ ,  $Sp$ ,  $PV^+$ ,  $PV^-$ ) változók meghatározása mellett kalkuláltunk átlagot, mediánt, standard deviációt ( $SD_{\pm}$ ), ill. megbízhatósági tartományt (95% CI).

<sup>17</sup> a betegség prevalenciája azaz, a betegség szempontjából pozitív egyedek aránya, nem ismervén még a diagnosztikai teszt kimenetelét.

<sup>18</sup> megegyezik a pozitív prediktív értékkel a betegnek ítélt embereknél, ill. a negatív prediktív értékkel a betegnek nem ítéltéknél.

### 7.2.1 ROC analízis

A ROC (Receiver Operating Characteristic) analízist a II. világháborúban fejlesztették és használták először radarjelek elemzésére. Eredményességének köszönhetően már az 1950-es évektől széleskörű alkalmazása volt megfigyelhető, elsősorban az orvosi diagnosztika területén. Használják ugyanis bizonyos diagnosztikai vizsgáló módszerek hatékonyságának vizsgálatára. Nagy előnye, hogy alkalmas a különböző modellek megkülönböztető képességének grafikus megjelenítésére.

A két összevetendő módszer (esetünkben a *facC*-PCR, ill. a GM-EIA) diagnosztikai hatékonyságának méréséhez a tesztek változó (kvantitatív) eredményeit, 77 GM-EIA index és 249 *facC*-PCR Cq (Függelék 2) megfelelő kvantitatív (pozitív/negatív) eredményekké kell alakítanunk, alapul véve a mintákat szolgáltató epizódok aktuális egészségügyi állapotát az ITA fertőzés szempontjából (eset csoport és kontroll csoport).

*FacC*-PCR esetében minden PCR futást külön analizáltunk. Szenzitivitási (Se) és specificitási (Sp) mutatókat kalkuláltunk az egyes döntési tartományoknál, majd ROC görbét szerkesztettünk oly módon, hogy a valós pozitív (y tengelyen szenzitivitás értékek) értékeket ábrázoltuk a fals-positívok (1-specificitás értékek az x tengelyen) függvényében. Görbe alatti területet számoltunk 95%-os megbízhatósági tartománnyal (95% CI), ill. standard hibával ( $\pm$ SD).

Amennyiben a görbe alatti terület, azaz Area Under the Curve = AUC, vagy Area Under ROC = AUROC:

- ❖  $1 > AUC \geq 0.9$  a vizsgált teszt kiemelkedő diagnosztikai pontossággal rendelkezik.
- ❖  $0.9 > AUC \geq 0.8$  a vizsgált teszt jelentős diagnosztikai pontossággal rendelkezik.
- ❖  $0.8 > AUC \geq 0.7$  a vizsgált teszt megfelelő diagnosztikai pontossággal rendelkezik.
- ❖  $0.7 > AUC \geq 0.6$  a vizsgált teszt mérsékelt diagnosztikai pontossággal rendelkezik.
- ❖ Végezetül pedig  $0.6 > AUC \geq 0.5$  arra utal, hogy adott klinikai vizsgáló módszer használhatatlan *in vitro* tesztelésre.

A görbe alatti terület meghatározása mellett számoltunk pozitív és negatív likelihood arányokat ( $LR^+$ ,  $LR^-$ ), ill. pozitív és negatív prediktív értékeket ( $PV^+$ ,  $PV^-$ ) is.

## 7.2.2 Diagnosztikai vizsgáló módszerek összehasonlítása Kappa-tesztrel

A gold-standard *Aspergillus Platelia* GM-EIA ill. az új, bevezetésre váró módszer, esetünkben *facC*-PCR diszkriminátor által generált eredmények közti kondordancia vizsgálata érdekében Cohen féle Kappa tesztet végeztünk, amely figyelmen kívül hagyja a betegek valós státuszát, mindösszesen csak azt vizsgálja, hogy a két diagnosztikai teszt (operátor) által generált eredmények milyen mértékben egyeznek, illetve egyezésük milyen mértékben tudható be a véletlennek (12. ábra).

	PCR+	PCR-	Összesen:
GM+	8	3	11
GM-	20	46	66
Összesen:	28	49	77

### 12. ábra. Diagnosztikai vizsgáló módszerek (*Aspergillus Platelia* GM-EIA, ill. *facC*-PCR) közti egyezés vizsgálata Kappa-tesztrel.

A 2x2-es táblázat egyes rubrikái azt jelölik, hogy az egyes diszkriminátorok vizsgálati eredményei milyen mértékű egyezést mutattak.

$K=1$  érték tökéletes egyezést jelöl, míg a  $K=0$  érték arra utal, hogy a diagnosztikai tesztek által generált eredmények közti egyezés nem nagyobb annál, mint amit a véletlen generálna. A 0.8-nál magasabb értékek kiemelkedő egyetértésre utalnak, 0.6-0.8 közti tartományba eső értékek jelentős egyetértésre utalnak, 0.41-0.6 közti tartományba eső mutatók még megfelelő egyetértésre utalnak, végül pedig a 0.21-0.4 közti tartományba eső értékek pedig mérsékelt egyetértésre utalnak.

Módszer összehasonlításaink során a *SigmaPlot* ill. a *GraphPad* statisztikai analízáló programokat használtuk, melyek közül az utóbbi online, bárki számára szabadon hozzáférhető <http://graphpad.com/quickcalcs/kappa>. A lineáris regressziót, a ROC analízist bemutató, ill. a dot-plot ábráink kivétel nélkül hiteles, SigmaPlot ábrák. *Venn-diagram*jainkon bemutatott *Aspergillus* GM-EIA ill *facC*-PCR önálló módszerek, ill. kombinált biomarker tesztelésünk statisztikai mutatóit a fent vázolt összefüggések alapján *Excel* program segítségével számoltuk.

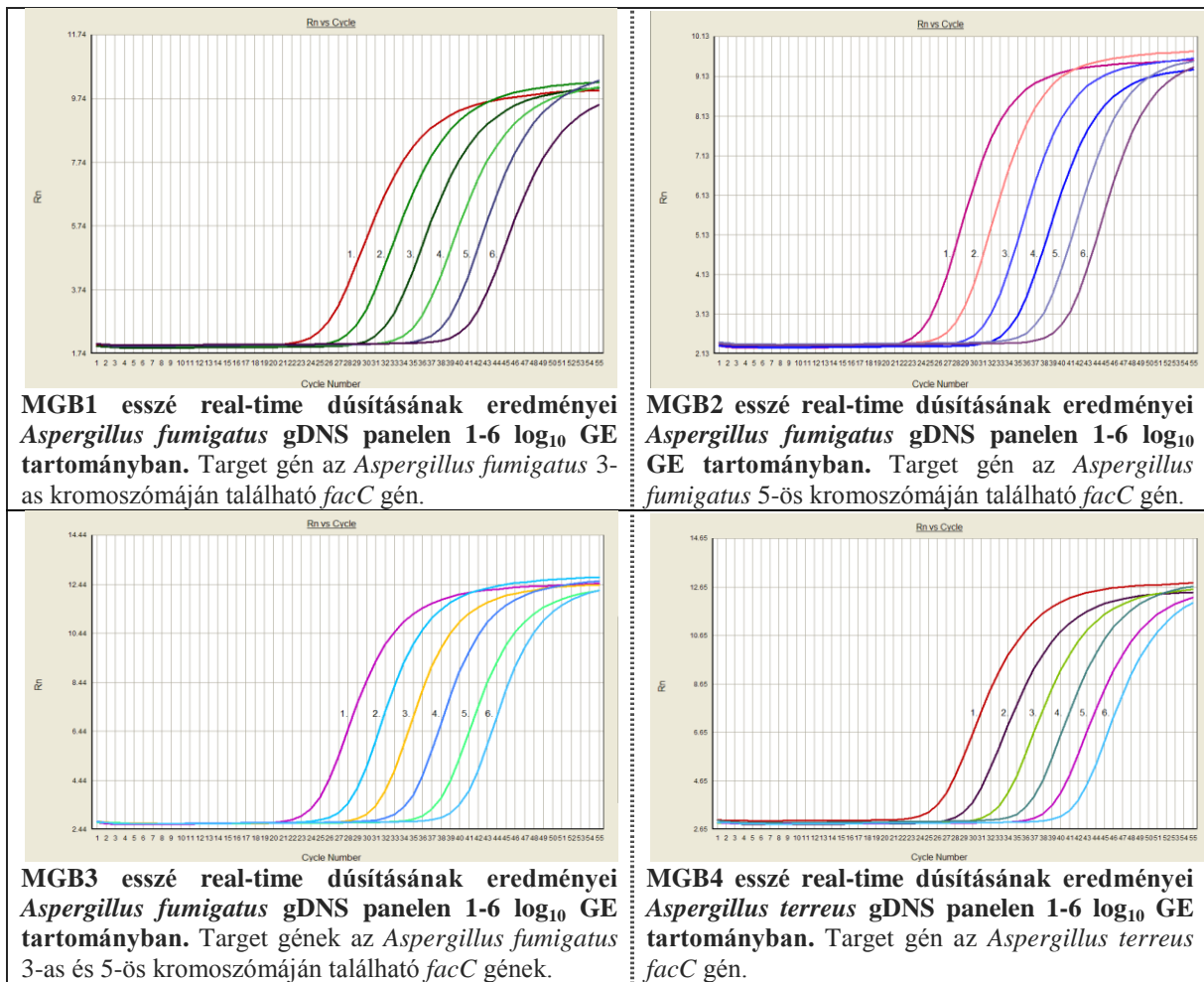
## 8. EREDMÉNYEK

### 8.1 *FacC* ortológ gének jelenlétét igazoltuk aszpergillózist okozó humánpatogén fajokban

Az érett C-faktor fehérje aminosav szekvenciáját PSI-BLAST homológiakereső programokkal vizsgáltuk és hozzá nagyon hasonló ortológ, valószínűsíthetően közös evolúciós eredettel rendelkező géneket találtunk négy humánpatogén fonalas gombafajban; *Aspergillus fumigatus* Af293, *Aspergillus terreus* NIH2624, *Neosartorya fischeri* NRRL181, *Chaetomium globosum* CBS148.51, valamint további két apatogén fonalas gombában; *Podospora anserina*, *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255, ill. egyéb más *Streptomyces* fajokban; *Streptomyces scabies* 87.22, *S. ambofaciens* ATCC 238777, *S. erythreus* NRRL2338 és *S. venezuelae* ATCC 10712, néhány Gram-pozitív, nem *Actinomyces*, alacsony G+C tartalmú baktériumban; *Bacillus subtilis* és *Listeria monocytogenes*, valamint ezek fágjaiban (5.1 fejezet). Az *Aspergillus fumigatus* Af293 genomában egyszerre két példányban, a 3-as (AFUA\_3G14910) és az 5-ös (AFUA\_5G00540) kromoszomán is megtalálhatóak a C-faktor ortológ gének. Az *Aspergillus terreus* IH2624 genomában csak egyetlen példány található.

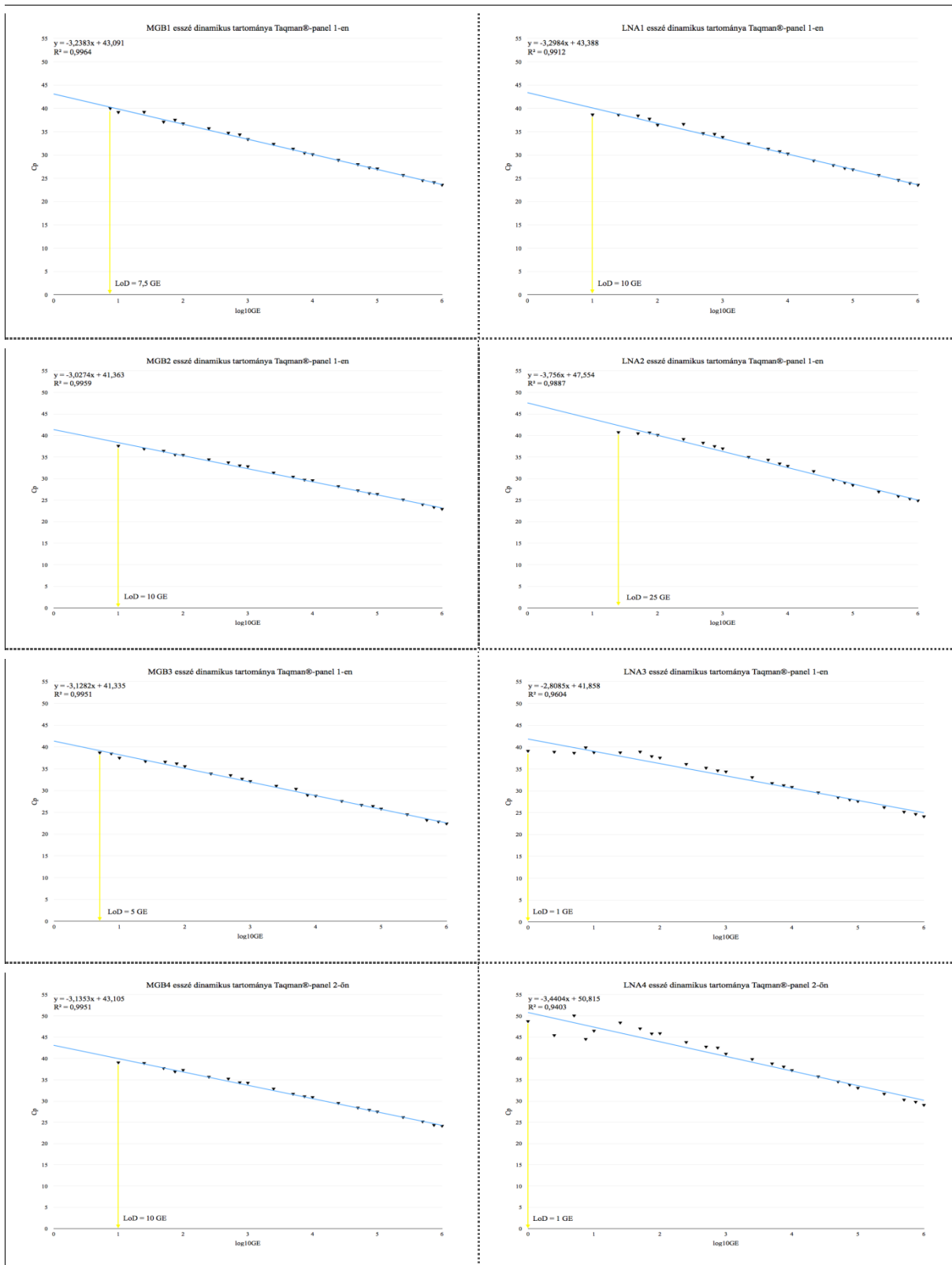
## 8.2 Taqman®-MGB és Taqman®-LNA esszék dinamikus tartománya gDNS paneleken

Nyolc különböző Taqman® esszét fejlesztettünk és teszteltünk *Aspergillus fumigatus* (MGB1, MGB2, MGB3, LNA1, LNA2, LNA3) és *Aspergillus terreus* (MGB4, LNA4) fajok szenzitív detektálására és azonosítására (5.2.1, 5.2.2 fejezet-ek). Az 5.4 fejezet-ben vázolt módon meghatároztuk *Aspergillus fumigatus* Af293 ill. *Aspergillus terreus* IH2624 gDNS tartalmú nukleinsav paneleken (Taqman®-panel 1, Taqman®-panel 2) az egyes real-time esszéink reakció hatékonyságait, ill. detektációs küszöb (LoD) értékeit (13. táblázat és 14. ábra). Real-time esszéink amplifikációs görbéinek logaritmusos ábrázolását a teljesség igénye nélkül, csak az MGB esszék esetén mutatjuk be a 13. ábrán.



13. ábra. MGB1, MGB2, MGB3, ill. MGB4 real-time esszék amplifikációs görbéinek logaritmusos ábrázolása *Aspergillus fumigatus* Af293 és *Aspergillus terreus* IH2624 tartalmú Taqman®-paneleken.

6 log<sub>10</sub> tartományú (1 = 15 ng; 2 = 1,75 ng; 3 = 150 pg; 4 = 15 pg; 5 = 1,5 pg és 6 = 150 fg) *Aspergillus fumigatus* és *Aspergillus terreus* genomi DNS tartalmú panelek dúsításának valós-idejű nyomonkövetése logaritmusos amplifikációs görbéket eredményez ahol a ciklusok végén mért fluoreszcens jel intenzitását ábrázoljuk a ciklusszámok függvényében.



**14. ábra. Taqman®-MGB és Taqman®-LNA esszéink amplifikációs görbéi lineáris ábrázolásban, 7 log<sub>10</sub> tartományú, *Aspergillus fumigatus* Af293 és *Aspergillus terreus* IH2624 gDNS paneleken.**

Az ábra bal oldalán Taqman®-MGB, míg az ábra jobb oldalán Taqman®-LNA esszéink 7 log<sub>10</sub> tartományú (15 ng – 15 fg), 25 tagból álló, hígítási panelein mért, átlag C<sub>p</sub> értékeit ábrázoltuk a GE-ek 10-es alapú logaritmusának függvényében.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a 13. táblázat-ban vastagon kiemelt **Taqman®-LNA3** esszék bizonyult a legérzékenyebbnek *Aspergillus fumigatus* Af293 (LoD = 1 GE), míg az ugyancsak vastagon kiemelt **Taqman®-LNA4** esszék az *Aspergillus terreus* IH2624 (LoD = 1 GE) fajok érzékeny kimutatására annak ellenére, hogy méréseink alapján a Taqman®-LNA3 esszé reakció hatékonysága az optimális tartományon kívülre esett (E = 127%).

**13. táblázat. Taqman®-MGB, ill. Taqman®-LNA real-time esszék reakció hatékonyságának mérése a regressziós egyenesek egyenletének, meredekségének feltüntetésével és az esszék detektálási tartományaival (LoD).**

	Esszék	Egyenlet (y) =	Meredekség	Reakció hatékonyság (E = %)	R <sup>2</sup>	LoD (GE)
1	<b>MGB1</b>	-3,2383x+43,091	-3,2383	103,612	0,996	7,5
2	MGB2	-3,0274x+41,363	-3,0274	113,952	0,996	10,0
3	MGB3	-3,1282x+41,335	-3,1725	108,772	0,995	5,0
4	MGB4	-3,1353x+43,105	-3,1353	108,424	0,995	10,0
5	LNA1	-3,2984x+43,388	-3,2984	100,991	0,991	10,0
6	LNA2	-3,7560x+47,554	-3,7560	84,604	0,989	25,0
7	<b>LNA3</b>	-2,8085x+41,858	-2,8085	127,019	0,960	<b>1,0</b>
8	<b>LNA4</b>	-3,4404x+50,815	-3,9663	95,283	0,940	<b>1,0</b>

Vastagon emeltük ki azon *Aspergillus fumigatus* Af293 (Taqman®-LNA3) ill. *Aspergillus terreus* IH2624 gDNS-t (Taqman®-LNA4) detektálni képes esszéinket, amelyek a legalacsonyabb detektációs küszöbvel (LoD) rendelkeznek, így előzetes méréseink alapján a legérzékenyebbnek bizonyulhatnak IA okozó fajok azonosítására.

### 8.3 Taqman®-MGB esszék analitikai specificitása gDNS panelen

Az 5.4.2 fejezet-ben vázolt módon, kísérletesen igazoltuk, hogy az *Aspergillus fumigatus* Af293 és *Aspergillus terreus* IH2624 genomokban található *facC* ortológ génekhez hibridizáló Taqman®-MGB hidrolízis esszék (MGB3, MGB4) nem detektálják sem a másik faj, sem pedig pedig jó néhány egyéb vizsgált faj DNS-ében meglévő *facC* géneket (14. táblázat).

14. táblázat. *Aspergillus fumigatus*, ill. *Aspergillus terreus* specifikus real-time esszék különböző *facC* ortológokkal rendelkező, vagy nem rendelkező fajok genomi DNS izolátumain való tesztelések eredményei.

Vizsgált törzs	<i>facC</i> ortológ gén(ek)	Target gén		
		AFUA_3G14910	AFUA_5G00540	ATEG_03536
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293 és további 8 klinikai izolátum	<b>Megtalálható 2 gén</b>	+	+	-
<i>Aspergillus terreus</i> NCCB IH2624 és további 2 klinikai izolátum	<b>Megtalálható 1 gén</b>	-	-	+
<i>Aspergillus nidulans</i>	Hiányzik	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	Hiányzik	-	-	-
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Nincs adat	-	-	-
<i>Aspergillus lentulus</i>	<b>Megtalálható (saját adat)</b>	-	-	-
<i>Aspergillus flavus</i>	Hiányzik	-	-	-
<i>Aspergillus tamarii</i>	Nincs adat	-	-	-
<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	Nincs adat	-	-	-
<i>Aspergillus tubingensis</i>	Nincs adat	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	Hiányzik	-	-	-
<i>Trichoderma reesei</i>	Hiányzik	-	-	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<b>Megtalálható</b>	-	-	-
<i>Escherihia coli</i>	Hiányzik	-	-	-
<i>Streptomyces albidoflavus</i> 45H	<b>Megtalálható</b>	-	-	-
<i>Streptomyces griseus</i> 52-1	Hiányzik	-	-	-
<i>Streptomyces lividans</i> 1326	Hiányzik	-	-	-
<i>Streptomyces albus</i> R-55	<b>Megtalálható</b>	-	-	-
<i>Streptomyces flavofungini</i>	<b>Megtalálható</b>	-	-	-
<i>Homo sapiens</i>	Hiányzik	-	-	-

A (+) jelek pozitív, míg a (-) jelek a negatív real-time reakciókra utalnak.

## 8.4 Taqman®-LNA esszék analitikai specificitása a 2013-as ISHAM-EAPCRI panelen

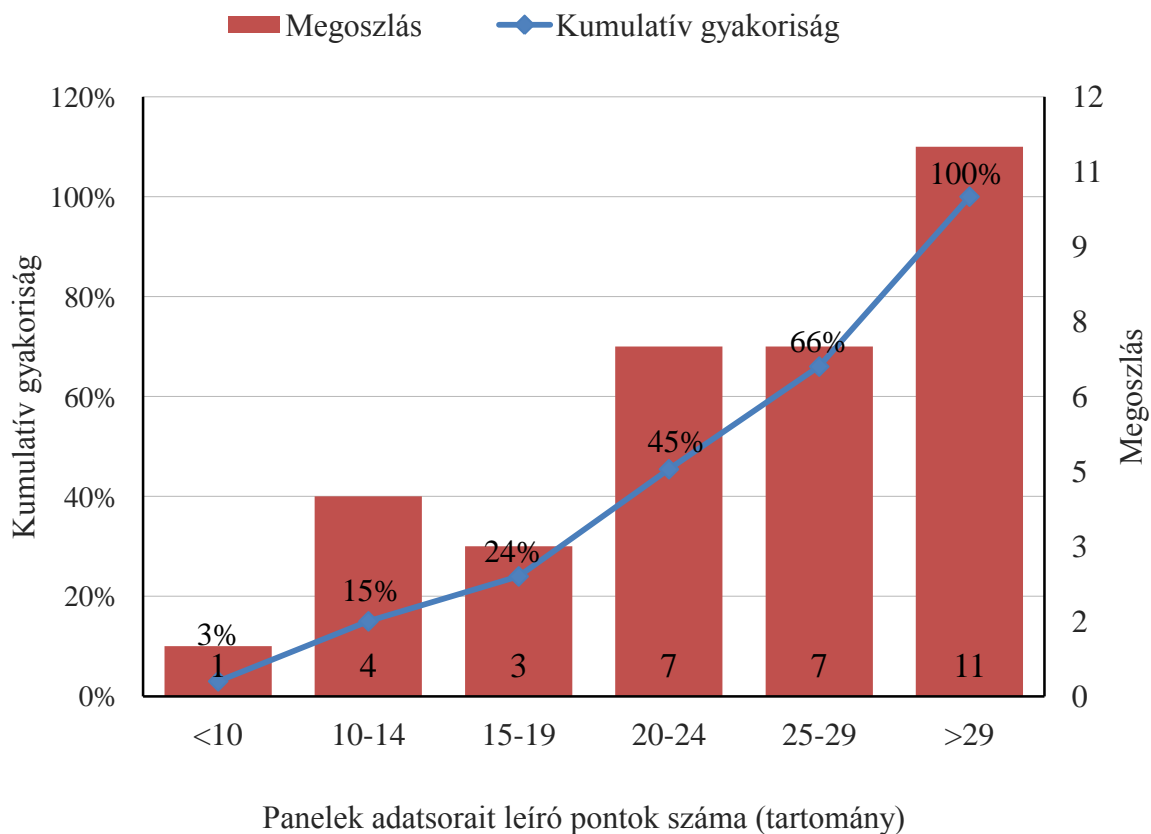
*Aspergillus fumigatus* specifikus Taqman®-LNA3, valamint az *Aspergillus terreus* specifikus Taqman®-LNA4 esszék analitikai specificitását vizsgáltuk a 2013-as ISHAM-EAPCRI panelen is, lásd 5.4.2 fejezet. Kapott eredményeinket a 15. táblázat-ban mutatjuk be.

**15. táblázat. A 2013-as EAPCRI gDNS panel eredményei real-time méréseink alapján.**

Minta ID	Minta gDNS tartalma	gDNS koncentráció (fg/μl)	Detektálás	Adható pont	Debrecen eredmények	Saját pont
1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	150	Alapvető fontosságú	3	Detektált	3
2	<i>Fusarium sp.</i>	500	Nem kívánt	1	Nem detektált	1
3	<i>Aspergillus niger</i>	150	Alapvető fontosságú	3	Nem detektált	0
4	<i>Penicillium sp.</i>	300	Nem kívánt	1	Nem detektált	1
5	<i>Cunninghamella sp.</i>	350	Nem kívánt	1	Nem detektált	1
6	<i>Aspergillus terreus</i>	1.7	Lényeges	2	Detektált	2
7	<i>Aspergillus flavus</i>	77	Alapvető fontosságú	3	Nem detektált	0
8	<i>Candida albicans</i>	170	Nem kívánt	1	Nem detektált	1
9	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.5	Alapvető fontosságú	3	Nem detektált	0
10	<i>Absidia sp.</i>	400	Nem kívánt	1	Nem detektált	1
11	<i>Aspergillus terreus</i>	170	Alapvető fontosságú	3	Detektált	3
12	<i>Aspergillus versicolor</i>	70	Alapvető fontosságú	3	Nem detektált	0
13	<i>Scedosporium sp.</i>	450	Nem kívánt	1	Nem detektált	1
14	<i>Aspergillus niger</i>	1.5	Lényeges	2	Nem detektált	0
15	<i>Aspergillus versicolor</i>	3.5	Lényeges	2	Nem detektált	0
16	<i>Aspergillus lentulus</i>	3	Lényeges	2	Nem detektált	0
17	<i>Aspergillus lentulus</i>	300	Alapvető fontosságú	3	Detektált	3
18	<i>Aspergillus flavus</i>	3.9	Lényeges	2	Nem detektált	0
<b>összesen:</b>				<b>37</b>	<b>összesen:</b>	<b>17</b>

A 2013-as ISHAM-EAPCRI panel a táblázatban feltüntetett törzsek gDNS izolátumait tartalmazta különböző koncentrációban. A pontjainkat (összesen 17 pont) annak megfelelően adták, hogy alapvető fontosságú-e az adott *Aspergillus* faj species szintű azonosítása (3 pont), ill. lényeges-e (2 pont). Nem kívánt fajok (nem *Aspergillus* genus) meg nem találását (azaz a negatívok negatívként való azonosítását) ugyancsak pontokkal (1 pont) értékelték.

A vizsgálat célja az volt, hogy meghatározza az ISHAM-EAPCRI szervezet laboratóriumi munkacsoportjának tagjai által használt (home-made) real-time aszpergillózis diagnosztikai PCR esszék detektálási tartományát, ill. specificitását. Az egyes panelek hat *Aspergillus* klinikai izolátum gDNS mintáit tartalmazták különböző koncentrációban, közülük egy törzs (*Aspergillus lentulus*) mutat jelentős genetikai egyezést az *Aspergillus fumigatus* genommal, illetve öt másik olyan törzset, amelyek potenciális kontaminációs források lehetnek a klinikai gyakorlatban. A helyes találatok meglétét, ill. a fals találatok hiányát (azaz a negatívok negatívként való azonosítását) pontoszták (14. táblázat), majd ezeket a végén összesítették, s ennek megfelelően állítottak fel egy rangsort.



**15. ábra. Különböző fajok gDNS-eit tartalmazó panelek analizésével kapott 33 teljes adatsor pontjainak megoszlását és kumulatív gyakoriságát bemutató diagram.**

A piros oszlopdiagramok alján feltüntetett szám adatok az egyes tartományokba sorolt adatsorok megoszlására utalnak. A kézzel jelölt görbe a gyakoriságok változásának alakulását írja le úgy, hogy az egyes, kék pontoknál feltüntetett %-os értékek azon adatsorok kumulatív gyakoriságára utalnak, amelyek kevesebb pontot értek el, mint a soron következő tartományokba soroltak.

Összesített pontjaink száma 17 a maximálisan adható 37-ből. Ilyen eredményt a körkontrollós vizsgálatba bevont más munkacsoportok által szolgáltatott 27 adatsor (összesen 33 teljes adatsor, lásd 15. ábra) volt képes elérni, ill. meghaladni. Átlag 24.21 (SD±7.96). A legkevesebb pontot elért adatsor 6 pontot kapott, míg a legmagasabb érték 35 volt (15. ábra). *Aspergillus fumigatus* ill. *Aspergillus terreus* specifikus esszéink egyetlen esetben sem reagáltak más fajok gDNS-ével egyetlen kivétellel. *Aspergillus fumigatus* specifikus esszé (Taqman®-LNA3) egy esetben kereszt reakciót mutatott az *Aspergillus lentulus* gDNS-ével.

## 8.5 HRM esszé dinamikus tartománya *Aspergillus fumigatus* és *Aspergillus lentulus* gDNS paneleken

*Aspergillus fumigatus* *facC* ortológgal nagyfokú hasonlóságot mutató és közel azonos méretű (900-950 bp) génszakaszok (AFUA\_3G14910, AFUA\_5G00540) meglétét igazoltuk az *Aspergillus lentulus* SZMC3118 genomban. Az *Aspergillus fumigatus* AFUA\_3G14910 *facC* génspecifikus primerekkel felsokszorozott amplikonokat megszekvenáltattuk. A szekvenálás eredményét és a továbbra sem ismert szekvencia részeket a 16. ábra mutatja.

### *Aspergillus lentulus* *facC* ortológ

```

ATGACTCCGCTCGTCAAAGTCGGCAGCXXXXXXXXXXCGCTTGCTTTGGATCCACTTTGGT
ATCGCGACAGTCAACGCCAGCATCCCCTCATCCAAACGCTTCGATCTCTCCGCTCCCTCA
TACGACCTCTACCGCCACAAGACCCTCCGCGATGACACAGTCCAGCAGGGATTTCGCTTT
GACAACGTCAACCGCCGCCTTTTCGTGCGCACAGCGCCGCGACGGATCCTCCGAAACAGCA
GGCGACCTGACAATCACCCAGCTCGACTTTGACGGCAACTACGTCGGCCACATGTACCTA
AAGGACTTTGGCCACGGCGTTTCCTTCGGCGCACAGCCCGTCGGGTCCGCAACCTACCTC
TGGACAGAGGTTCGAGGCCAACGCCAACGGCTACGGCAAGAGACTCGCCCGTTCAAGTTC
GTCTCTGGTACCACGCTGACCAGCTCCTCCGCTGGCCTGGCTAAATTCAAGCCCGTCGCA
GACGCAACGGAGCATACTGCGCCATTGACCCGGTCTACAACCGGTTGATCGTCCGGTAT
AACCTCAGCGGGGCGAAGCATATCGCCGTGTATGACCTCGCTGCCGCGACGAGGGGGGAT
TTCTCCGCGCCGCTGGCGAATTTTAAGCAGCCGGCGTTGGAGGCGCTGTCGTCGGTCTTT
CAAGGTTATGCGGCGTACGGTCAGTATCTGTACCTGTTGACTGGGACTGCGTACGCGGCC
AGCGGGGGGAAGGTCAATTCCGAGGTTACCAGTGTGATATGAACACGGGCAAGTGGTGC
AGGGGCCGACGCTCACCAAGCCGGTTCGACGCTGGAGTACAGAGAGCCGGAGGATTGGCG
ATTTATAAGACTGCTGCTGGGGAGGTGAGGTTGTTGGGTTTTGCTTCGGGXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCTGTTCTACAAGAATGTGTTGGTTTAG

```

### 16. ábra. *Aspergillus lentulus* *facC* ortológ gén szekvenciája.

Az ábrán sötétkékkel jelöltük az *Aspergillus lentulus* *facC* ortológ gén amplifikálásához és szekvenálásához tervezett primereket, ill. pirossal jelöltük azokat, amelyeket az *Aspergillus fumigatus*, ill. *Aspergillus lentulus* fajok olvadáspont analízissel történő azonosításához használunk. FumilentF (pirossal jelölt forward primer): 5'-GCCAGCATCCCCTCATCC-3', 18 mer. Olvadáspont (T<sub>m</sub>): 68,2. GC tartalom (G+C %): 66,6. FumilentR (pirossal jelölt reverse primer): 5'-GCTGGACTGTGTCATCGCG-3', 19 mer. Primerek olvadáspontjai (T<sub>m</sub>): 68,4. GC tartalom (G+C %): 63,1. A világoskék X-el jelölt nukleotidok szekvenciája nem ismert az *Aspergillus lentulus* genomban.

Primereket terveztünk a megszekvenált *Aspergillus fumigatus* Af293 és *Aspergillus lentulus* SZMC3118 fajok *facC* gének érzékeny detektálására, felsokszorozására és az ampikonok jellemző olvadáspontjai alapján a fajok specifikus azonosítására (16. ábra)

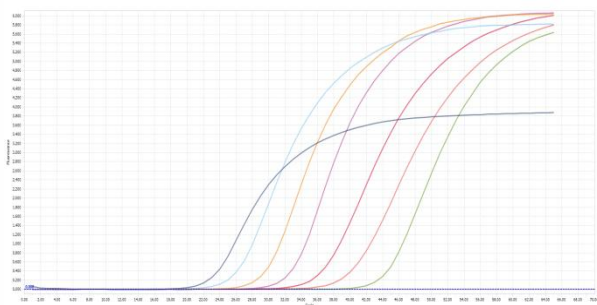
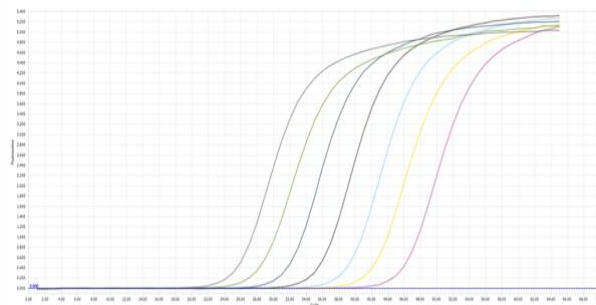
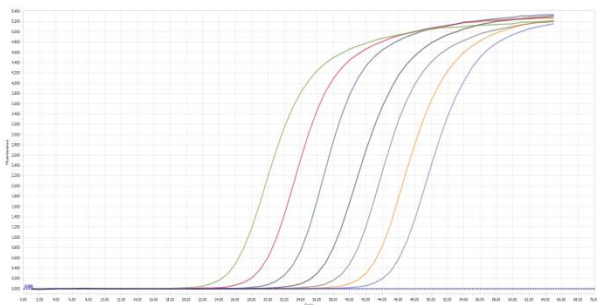
*Aspergillus fumigatus* Af293 és *Aspergillus lentulus* SZMC3118 genomi DNS tartalmú paneleket (HRM-panel 1, HRM-panel 2, HRM-panel 3) készítettünk 7 log<sub>10</sub> tartományban (10<sup>6</sup>-1 GE/PCR reakció). A 16. táblázat-ban bemutatott, különböző gDNS tartalmú kalibrációs paneleken, meghatároztuk az *Asperillus*-HRM esszé reakció hatékonyságát, ill. LoD értékeit (5.5.1 fejezet).

**16. táblázat.** *Aspergillus fumigatus* és *Aspergillus lentulus* HRM esszé amplifikációs hatékonyságának és detektációs küszöb értékének (LoD) vizsgálata

	Esszék	Egyenlet (y) =	Meredekség	Reakció hatékonyság (E = %)	R <sup>2</sup>	LoD (GE)
1.	<b>HRM-panel 1</b> <i>Aspergillus fumigatus</i> gDNS	-3,3289x+44,623	-3,3289	99,701	0,996	1
2.	<b>HRM-panel 2</b> <i>Aspergillus lentulus</i> gDNS	-3,4443x+44,460	-3,4443	95,135	0,999	1
3.	<b>HRM-panel 3</b> <i>Aspergillus fumigatus</i> és <i>Aspergillus lentulus</i> 1:1 gDNS	-3,4496x+42,440	-3,4496	94,935	0,994	1

HRM esszénk analitikai szenzitivitásának és LoD értékeinek vizsgálatát 7 log<sub>10</sub> tartományú (17 ng-17 fg) *Aspergillus fumigatus* Af293 gDNS tartalmú (panel-1), ill. *Asperillus lentulus* SZMC3118 gDNS tartalmú (panel-2), valamint ezek 1:1 arányú keverékével létrehozott (panel-3) paneleken végeztük.

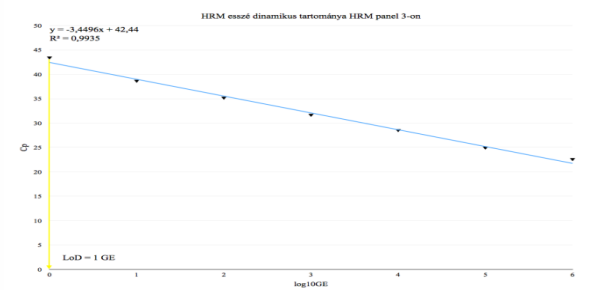
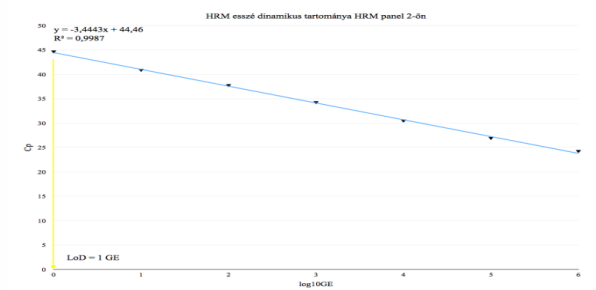
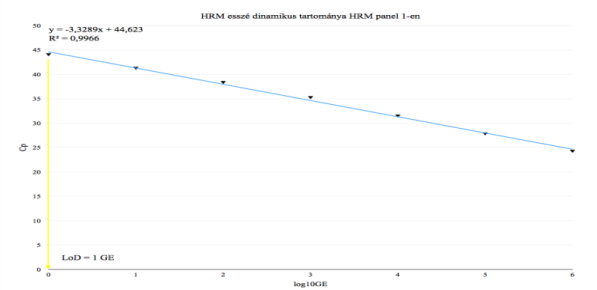
Ezt követően pedig meghatároztuk az *Aspergillus fumigatus* Af293, ill. *Aspergillus lentulus* SZMC3118 fajok ampikonjainak a jellemző olvadási pontjait, a fajok specifikus azonosítására (17. ábra).



**HRM esszé real-time dúsításának eredményei *Aspergillus fumigatus* Af293 gDNS tartalmú panelen.** Target gén az *Aspergillus fumigatus* 3-as kromoszómáján (AFUA\_3G14910) található *facC* ortológ gén.

**HRM esszé real-time dúsításának eredményei *Aspergillus lentulus* SZMC3118 gDNS tartalmú panelen.** Target gének az *Aspergillus lentulus* genomban található, feltételezett *facC* ortológ gén.

**HRM esszé real-time dúsításának eredményei *Aspergillus fumigatus* Af293 és *Aspergillus lentulus* SZMC3118 gDNS tartalmú panelen.** A target gének a már említett gének.

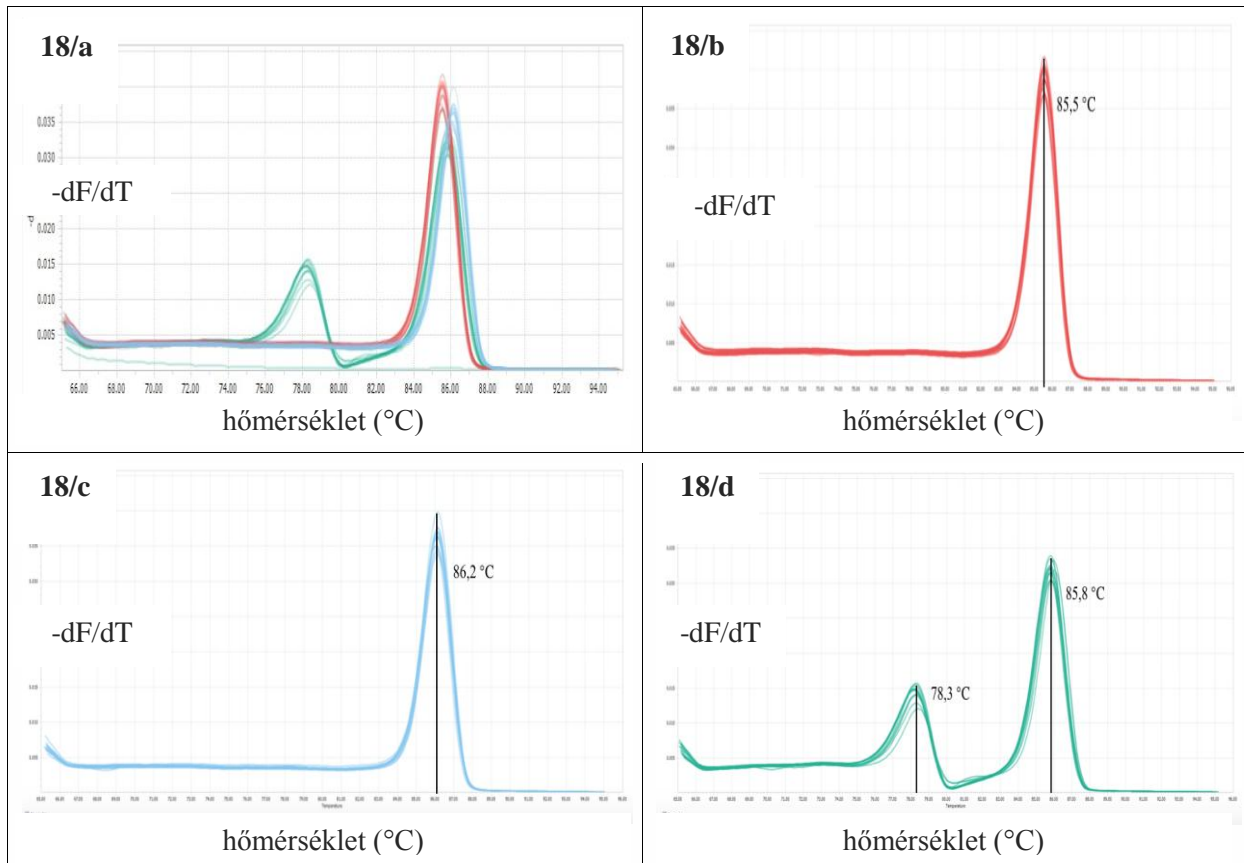


**HRM esszé dinamikus tartománya *Aspergillus fumigatus* Af293 tartalmú hígítási panelen.** Az átlagolt Cp értékeket ábrázoltuk a GE-ek 10-es alapú logaritmusának függvényében 7 log<sub>10</sub> tartományban (15 ng – 15 fg).

**HRM esszé dinamikus tartománya *Aspergillus lentulus* SZMC3118 tartalmú hígítási panelen.** Az átlagolt Cp értékeket ábrázoltuk a GE-ek 10-es alapú logaritmusának függvényében 7 log<sub>10</sub> tartományban (15 ng – 15 fg).

**HRM esszé dinamikus tartománya *Aspergillus fumigatus* Af293, ill. *Aspergillus lentulus* SZMC3118 tartalmú hígítási panelen.** Az átlagolt Cp értékeket ábrázoltuk a GE-ek 10-es alapú logaritmusának függvényében 7 log<sub>10</sub> tartományban.

**17. ábra.** HRM esszék amplifikációs görbéinek logaritmusos és lineáris ábrázolása 7 log<sub>10</sub> tartományú gDNS tartalmú paneleken (HRM panel-1, HRM panel-2, HRM panel-3).



**18. ábra. Fajspecifikus ampliconok olvadáspontjainak alakulása nagyfelbontású olvadásgörbe analízissel (HRM), ResolightDye festék jelenlétében.**

**18/a ábra.** Az emittált fluoreszcencia változásának nagyfelbontású nyomonkövetése (HRM analízise) leolvadási görbéket (*Aspergillus fumigatus* HRM panel-1 esetén piros, *Aspergillus lentulus* HRM panel-2 esetén kék, míg *Aspergillus fumigatus* és *Aspergillus lentulus* templátok 1:1 arányú keverékét tartalmazó HRM panel-3 esetén zöld görbék) eredményez, amelyek negatív deriváltjainak csúcsai jelölik az egyes amplicon elegyek olvadási pontjait (olvadáspont analízis). Ezek ismeretében következtethetünk a reakcióelegyekben jelen levő, *Aspergillus fumigatus* Af293, ill. *Aspergillus lentulus* SZMC3118 specifikus amplicon molekulák jelenlétére. **18/b ábra.** *Aspergillus fumigatus* Af293 *facC* ortológ génről képződött nukleinsav ampliconok olvadáspontja: 85,5°C. **18/c ábra.** *Aspergillus lentulus* SZMC3118 *facC* ortológ génről képződött nukleinsav ampliconok olvadáspontja: 86,2°C. **18/d ábra.** *Aspergillus fumigatus* Af293 és *Aspergillus lentulus* SZMC3118 fajok *facC* ortológ géneiről képződött nukleinsav ampliconok leolvadási görbéinek nagyfelbontású analízise. A deriválást követően a görbék egymásra vetítésével két, markánsan elkülönülő csúcsot kapunk, melyek olvadás pontjai: 78,3°C és 85,5°C. Az alacsonyabb csúcsok (78,3°C) a heteroduplexek jellemző (különböző fajtájú, nem teljesen komplementer *Aspergillus fumigatus* Af293 ill. *Aspergillus lentulus* 3118 hibrid ampliconok) olvadáspont értékeit, míg a magasabb csúcs (85,5°C) az izoduplexek jellemző (azonos fajtájú, komplementer, *Aspergillus fumigatus* Af293 és *Aspergillus lentulus* SZMC3118 duplaszálú ampliconok) olvadáspontjaira utal. Ezen utóbbi csúcs ugyanis nem egy, hanem két jellemző olvadásponttal rendelkező, *Aspergillus fumigatus* (85,5°C) és *Aspergillus lentulus* (86,2°C) specifikus csúcsok együttes jelenlétére (*Aspergillus fumigatus* és *Aspergillus lentulus* amplicon elegy esetén a kapott olvadáspont a tiszta elegyek esetén tapasztalt csúcsok olvadáspontjainak median értéke) utal.

## 8.6 Aszpergillózis detektáló Taqman® esszék dinamikus tartománya konídium tartalmú biológiai mintákon

Az IA nyomonkövetésére alkalmas nukleinsav detektáláson alapuló módszerek diagnosztikai hatékonyságát a gomba nukleinsav feltáró módszer kihozatala és a real-time rendszerű detektálás alapvetően befolyásolják.

*Aspergillus fumigatus* (Taqman®-MGB3, Taqman®-LNA3) ill. *Aspergillus terreus* (Taqman®-MGB4, Taqman®-LNA4) specifikus, real-time esszék dinamikus tartományát vizsgáltuk teljes vér és szérum mintákon az 5.6 fejezet-ben bemutatottak alapján. Vérmintákhoz (1000 µl) 7 log tartományban gomba konídiumokat mértünk ( $10^6$ - $10^0$ ), és hígítási sorokat készítettünk. A konídiumok mechanikus lízisét követően (5.6.3 fejezet) (Roche, MagNA Lyser) a nukleinsav izolálás automata rendszerben történt (Roche, MagNA Pure LC 2.0).

A nagyszámú minták analízisét követően a panelek egyes hígítási tagjainál kapott Ct értékeket a hígítások 10-es alapú logaritmusainak függvényében ábrázoltuk, majd ezekre standard görbét illesztettünk. A kapott regressziós egyenesek képletét, meredekségét, a kalkulált reakció hatékonyságokat és az esszék kapott LoD értékeiket a 17. táblázat-ban tüntetjük fel.

**17. táblázat. Taqman®-MGB és Taqman®-LNA real-time esszék amplifikációs hatékonysága konídium tartalmú szérum mintákon.**

	Esszé	Egyenlet (y) =	Meredekség	Hatékonyság (%)	LoD (GE)
1.	MGB3	-3,5911x+45,107	-3,5911	89,874	10,0
2.	MGB4	-3,0706x+41,635	-3,0706	111,675	1,0
3.	LNA3	-3,2757x+53,939	-3,2757	106,64	1,0
4.	LNA4	-3,2617x+44,456	-3,2617	102,5763	1,0

Biológiai minták analízisén végzett eredményeink alapján megállapítható, hogy a Taqman®-LNA hidrolízis esszéink reakció hatékonyságai bizonyultak a legjobbnak, reakció hatékonyságuk optimális tartományon belülre estek (E = 103-107%) a konídium tartalmú teljes vér panelek analízise során. E mellett, mind a Taqman®-LNA3, mind pedig az Taqman®-LNA4 esszénk (az *Aspergillus terreus* specifikus Taqman®-MGB4 esszéhez hasonlóan) képes volt egyetlen, *Aspergillus fumigatus*, ill. *Aspergillus terreus* gomba genom érzékeny (LoD = 1 GE), specifikus azonosítására.

## 8.7 Taqman®LNA3 és Taqman®LNA4 esszék dinamikus tartománya nagyszámú szérum mintán

Annak ellenére, hogy a valóságban (a teljes vér és a BAL mintákkal ellentétben), a szérum mintákban gomba konídiumok nem találhatóak, Taqman®-LNA esszéink diagnosztikai hatékonyságának, ill. dinamikus tartományának mérését nagyszámú, konídium tartalmú szérum mintákon végeztük. Azt vizsgáltuk, hogy tapasztalható-e bármilyen PCR inhibíció a Vacutainer, sárga kupakos, gélszeparátoros szérum csövekkel való munka esetén. 184 darab, különböző mennyiségű, *Aspergillus fumigatus* Af293 (128 db) ill. *Aspergillus terreus* IH2624 (56 db) konídium tartalmú szérum mintát (250 µl) állítottunk elő (18. táblázat).

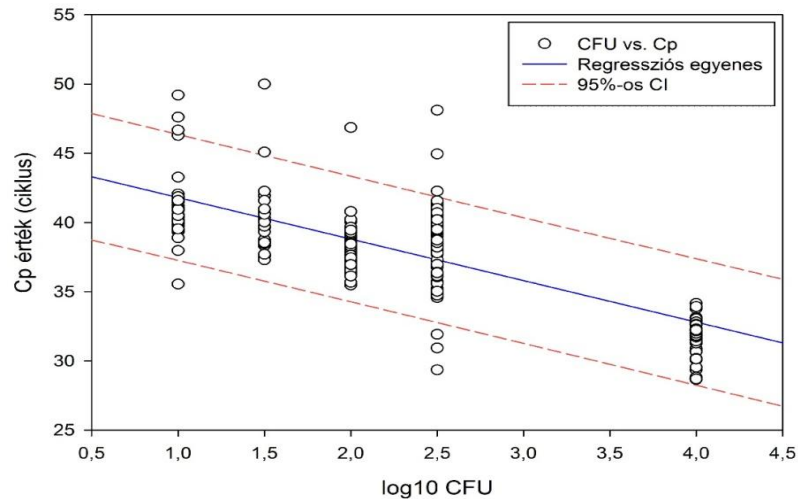
Taqman®-LNA próbás real-time esszéink dinamikus tartományának és a mechanikai lízis (5.6.3 fejezet), ill. az automata rendszerű, nukleinsav extrakció (5.6.4 fejezet) dinamikus tartományának meghatározásához 5 hígítási tagból álló ( $10^5$ - $10^1$ ), széles koncentráció tartományt lefedő, paneleket készítettünk.

**18. táblázat. Nagyszámú (184 szérum) szérum minta (250 µl), *Aspergillus fumigatus* Af293, ill. *Aspergillus terreus* SZMC3118 konídium tartalma, ill. a Taqman®-LNA3, valamint a Taqman®-LNA4 real-time esszéknek a különböző szérum mintákon mért pozitivitása, valamint a Cp értékek átlaga, és medián értékei.**

CFU/250 µl szérum	Pozitivitás (%)		Átlag Cp (95% CI)		Median Cp	
	LNA3	LNA4	LNA3	LNA4	LNA3	LNA4
10 000	100 (48/48)	100 (32/32)	31,99 (30,62-33,36)	32,29 (29,49-35,09)	31,96	32,55
316	100 (120/120)	100 (24/24)	37,81 (36,28-41,26)	37,26 (35,76-38,75)	37,97	37,33
100	100 (96/96)	97,92 (47/48)	38,77 (36,49-39,11)	38,38 (37,33-39,43)	38,65	38,43
32	93,75 (45/48)	91,66 (22/24)	40,22 (37,81-42,63)	39,09 (38,39-39,78)	40,43	39,16
10	91,66 (44/48)	83,33 (20/24)	40,87 (38,34-43,40)	41,35 (39,27-43,44)	41,15	41,83

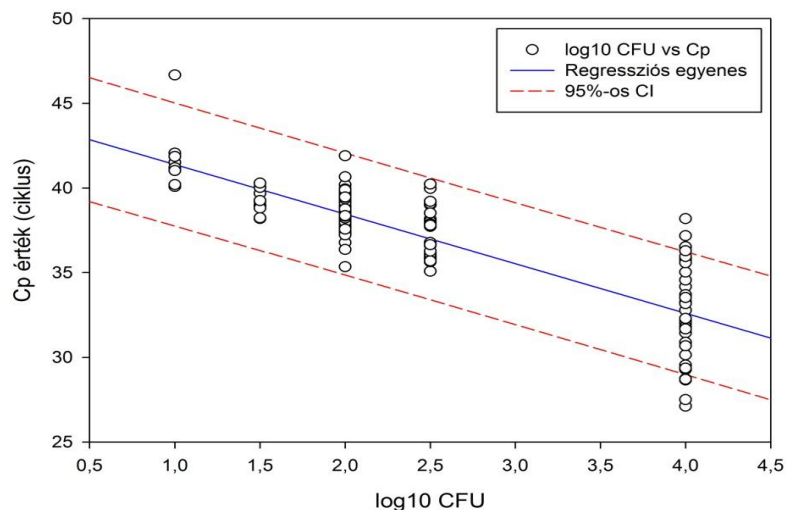
A mechanikai lízisen, automata rendszerű extrakción, ill. az *Aspergillus fumigatus* és *Aspergillus terreus* specifikus Taqman®-LNA esszéink használatán alapuló módszerek diagnosztikai hatékonyságainak megállapításakor nagyobb hangsúlyt kapott az *Aspergillus fumigatus* specifikus Taqman®-LNA3 esszé, hiszen ennek a fajnak lényegesen nagyobb a közegészségügyi jelentősége, mint amellyel az *Aspergillus terreus* bír. A mechanikus lízist és az automata rendszerű nukleinsav extrakciót követően, real-time rendszerben monitoroztuk az elútmokat *Aspergillus fumigatus* (Taqman®-LNA3), ill. *Aspergillus terreus* (Taqman®-LNA4) specifikus nukleinsav targetek jelenlétére (19/a és 19/b ábrák).

Az IA diagnózisára optimalizált automata rendszerű nukleinsav izoláló eljárás, ill. a Taqman®-LNA3, ill. Taqman®-LNA4 real-time rendszereink specificitását vizsgáltuk negatív kontrolloktól származó szérum mintákon (összesen 184 db). A vizsgált minták 4,3%-a (8/184) kontaminálódott az automata rendszerű nukleinsav extrakció során (nem bemutatott adat).



**19/a ábra. Lineáris regresszió *Aspergillus fumigatus* Af293 paneleken.**

A lineáris regresszió az *Aspergillus fumigatus* Af293 konídium tartalmú biológiai minták (128 db) mechanikai feltárását, automata rendszerű gomba nukleinsav extrakcióját és az elútmok Taqman®-LNA3 real-time analízisét követően kapott Cp értékeket (384 db) a CFU-k 10-es alapú logaritmusainak függvényében szemlélteti. A pontokra fektetett regressziós egyenes meredeksége 2,9626. Az esszé reakció hatékonysága konídium tartalmú biológiai mintákon 117,54%.



**19/b ábra. Lineáris regresszió *Aspergillus terreus* IH2624 paneleken.**

A lineáris regresszió az *Aspergillus terreus* IH2624 konídium tartalmú biológiai minták (56 db) mechanikai feltárását, automata rendszerű gomba nukleinsav extrakcióját és az elútmok Taqman®-LNA4 real-time analízisét követően kapott Cp értékeket (168 db) a CFU-k 10-es alapú logaritmusainak függvényében szemlélteti. A pontokra fektetett regressziós egyenes meredeksége 3,1454. Az esszé reakció hatékonysága konídium tartalmú biológiai mintákon 107,93%.

## 8.8 Invazív tüdőaszperillózis (ITA) infekciókontrollja

### 8.8.1 Esetcsoport, kontrollcsoport

Az egy éves nyomonkövetés során a vizsgálatba bevont 27 beteget EORTC/MSG irányelveknek megfelelően klinikus szakorvos sorolta retrospektív módon<sup>19</sup> az invazív tüdőaszpergillózis (ITA) háromfokozatú kategóriarendszerének - bizonyított, valószínű (eset csoport), ill. nem bizonyított (kontrollcsoport) - valamelyikébe (19. táblázat). A betegek 25,93%-a képezte az eset csoportot (7 beteg), míg a fennmaradó 74,07% a kontrollcsoportot (20 beteg).

19. táblázat. Beteg demográfiai mutatók.

Karakterisztika	Bizonyított ITA (n = 5)	Valószínű ITA (n = 2)	Nem bizonyítható ITA (n = 20)
Gyermek/felnőtt arány	0/5	0/2	6/14
Férfi/nő arány	4/1	0/2	12/8
Median életkor (év), (tartomány)	52 (26-75)	55 (27-55)	44.5 (16-70)
Átlag életkor (év), ±(SD)	47.4 ± 20.56	48.3 ± 18.9	38.45 ± 19.02
Hematológiai megbetegedés (típusa, száma)	AML, 3; EM, 1; NHL, 1	AML, 1; ALL, 1	AML, 6; ALL, 1; PTCL, 1; HL, 1; NHL, 2; MM, 2; EM, 7

Rövidítések: (ITA), Invazív tüdőaszpergillózis; (AML), Akut Myeloid Leukémia; (ALL), Akut Limfoblasztos Leukémia; (HL), Hodgkin Limfóma; (NHL), Non-Hodgkin Limfóma; (MM), Mielóma Multiplex; (PTCL), Perifériás T-sejtes Limfóma; (EM), egyéb malignitások.

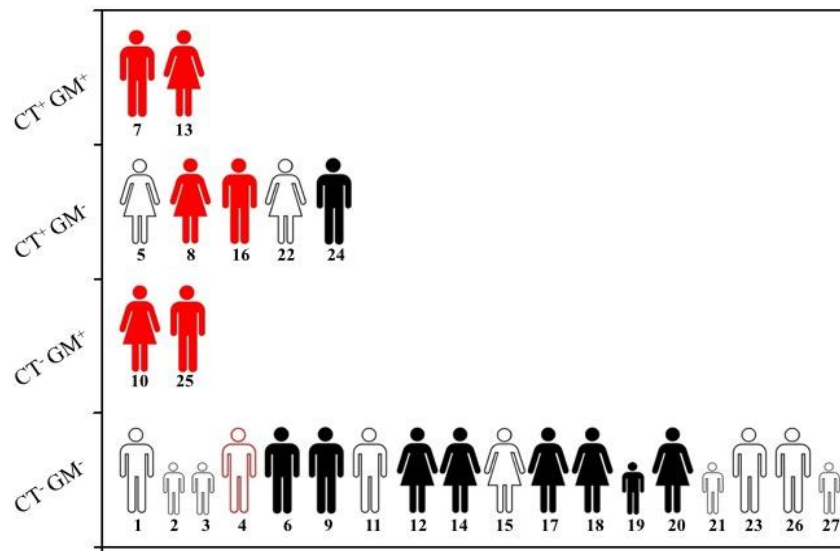
### 8.8.2 Empirikus antifungális terápia

A lázas neutropeniás epizódok közül 15 beteg (epizód 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 24, 25) a 27-ből (55,55%), amelyek esetében a széles spektrumú antibiotikum kezelés hatására sem mérséklődött, ill. szűnt meg a láz, empirikus antifungális terápiában részesültek (I. csoport). 60%-ukról (9 nem bizonyított ITA a 15 epizód közül) azonban később kiderült (epizód 6, 9, 12, 14, 17, 18, 19, 20, 24), hogy feleslegesen terhelték szervezetüket az erősen cito-és hepatotoxikus szerekkel. A betegek 44,44%-a (12 nem bizonyított ITA a 27 betegből) jól reagált az antibiotikum kezelésre (II. csoport), így esetükben nem volt szükséges az empirikus antifungális terápia.

<sup>19</sup> előzőleg elvégzett klinikai, radiológiai, mikrobiológiai vizsgálatok eredményeinek ismeretében.

### 8.8.3 Konvencionális módszerek invazív tüdőaszpergillózis detektálására

Vizsgáltuk, milyen mértékben korrelálnak az invazív tüdőaszpergillózis gyanúja esetén elvégzett mellkas CT eredmények az invazív beavatkozást nem igénylő *Aspergillus* GM szerológia, ill. az invazív beavatkozással járó BAL vizsgálatok eredményeivel (20/a, 20/b ábrák).



20/a ábra. Mellkas CT és az *Aspergillus* GM szerológia eredmények alakulása.

CT<sup>+</sup>-GM<sup>+</sup>; mellkas CT és *Aspergillus* GM-EIA szerológia által ITA pozitívnak (bizonyított/valószínű) diagnosztizált betegek. CT<sup>+</sup>-GM<sup>-</sup>; betegek pozitív mellkas CT és negatív *Aspergillus* GM-EIA szerológia lelettel. CT<sup>-</sup>-GM<sup>+</sup>; betegek negatív mellkas CT és pozitív *Aspergillus* GM-EIA szerológia lelettel. CT<sup>-</sup>-GM<sup>-</sup>; mellkas CT és *Aspergillus* GM-EIA szerológia által ITA negatívnak (nem bizonyított) diagnosztizált betegek. A fekete szimbólumok a kontroll-, míg a piros piktogramok az esetcsoport tagjait jelölik. Kontúrozott szimbólumok azon epizódokat jelölik, amelyek jól reagáltak az antibiotikus kezelés hatására (II. csoport), míg a beszínezettek azon epizódokra utalnak, amelyek esetében megmaradt a láz (I. csoport). Az átlagosnál kisebb piktogramok a gyerekekre utalnak. A szimbólumok alatt elhelyezkedő számok pedig a betegek azonosító (ID) számait mutatják.

Eredményeink alapján, egybehangzó negatív *Aspergillus* GM szerológia és ITA-ra nem utaló (negatív) mellkas CT leletek rendelkeznek a legmagasabb diszkriminációs hatékonysággal az aszpergillózis kizárására. Az esetek 94,5%-ában mutattak egybehangzó eredményeket, és nem utaltak ITA-ra. A két módszer negatív prediktív értéke; PV: 0,94.



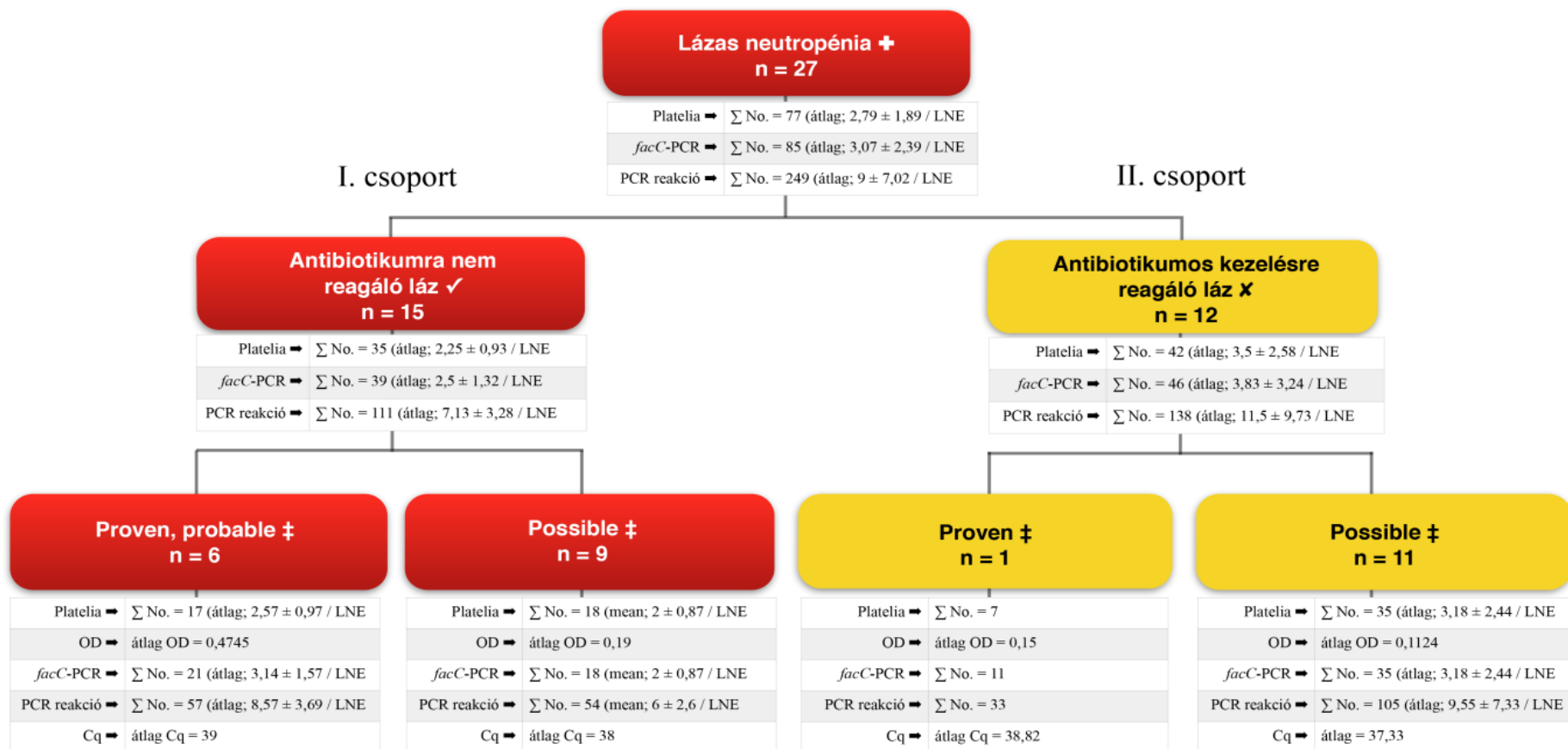
**20/b ábra. Mellkas CT eredmények és a BAL vizsgálatok alakulása.**

CT<sup>+</sup>-BAL<sup>+</sup>; mellkas CT és BAL által ITA pozitívnak (bizonyított/valószínű) diagnosztizált epizód(ok). CT<sup>+</sup>-BAL<sup>-</sup>; epizódok pozitív mellkas CT és negatív BAL lelettel. CT<sup>-</sup>-BAL<sup>+</sup>; epizódok negatív mellkas CT és pozitív BAL lelettel. CT<sup>-</sup>-BAL<sup>-</sup>; mellkas CT és BAL által ITA negatívnak (nem bizonyított) diagnosztizált epizódok. A fekete szimbólumok a kontroll-, míg a piros piktogramok az esetcsoport tagjait jelölik. Kontúrozott szimbólumok azon epizódokat jelölik, amelyek jól reagáltak az antibiotikus kezelés hatására (II. csoport), míg a beszínezettek azon epizódokra utalnak, amelyek esetében megmaradt a láz (I. csoport). Az átlagosnál kisebb piktogramok a gyerekekre utalnak. A szimbólumok alatt elhelyezkedő számok pedig a betegek azonosító (ID) számait mutatják.

Invazív BAL beavatkozást az epizódok 77%-ában (6 eset és 15 kontroll), megfelelő indikáció esetén végeztek. Konkordáns negatív mellkas CT és BAL ugyancsak magas diszkriminációs hatékonyságot mutatott az ITA kizárására, hiszen a PV<sup>-</sup> értéke 0,92 (1 fals negatív eset a 13-ból). Eredményeink alapján megállapítható, hogy az invazív BAL módszer a vizsgált 15 epizódot tartalmazó kontrollcsoport 93%-ában, azaz egyetlen eset kivételével (ID-5) képes volt kizárni az invazív tüdő aszpergillózist; PV<sup>-</sup>: 0,93. Meglepő azonban, hogy a BAL mindössze csak egyetlen olyan esetben volt képes az ITA diagnózisára (ID-10), melyben a mellkas CT vizsgálat fals negatív eredménnyel zárult.

#### 8.8.4 Biológiai marker monitorozások eredményei

Az egy éves nyomonkövetési időszak kombinált biomarker monitorozásának lezárultát követően a kapott analízisek (*Platelia Aspergillus* GM szerológia és *facC*-PCR) eredményeit, átlagát, szórását (átlag, ±SD), az invazív tüdő aszpergillózisok klinikus által becsült rizikójára való tekintettel, figyelembe véve azok antibiotikum kezelésre nem reagáló (I. csoport), ill. az enyhülő/ megszűnő lázas állapotokat (II. csoport) a 21. ábra mutatja.

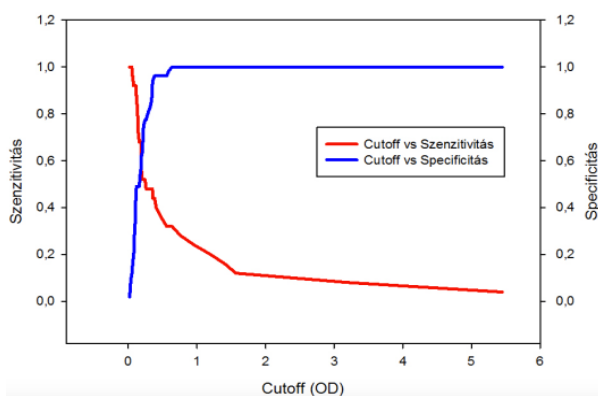


21. ábra. Kombinált biomarker monitorozás eredményeinek alakulása.

(+) neutrofil szám kevesebb, mint  $500 / \text{mm}^3$ . (✓) antibiotikum kezelésre nem reagáló, 96 órán túl fennálló láz (I. csoport); (X) antibiotikum kezelésre jól reagáló láz (II. csoport); (‡) az EORTC/MSG (European Organization for Research and Treatment of Cancer and Mycoses Study Group) irányelveknek megfelelően: proven = bizonyított, probable = feltételezett, possible = nem bizonyított ITA. (LNE) lázas neutropénia. Az egy éves nyomkövetés során összesen 162 biomarker analízis (mean;  $2.93 \pm 2.14/\text{LNE}$ ) történt. 77 szérumból vizsgáltunk (mean;  $2.79 \pm 1.89/\text{LNE}$ ) GM antigének jelenlétére. Ezzel együtt 85 facC-PCR analízist (mean;  $3.07 \pm 2.39/\text{LNE}$ ) és 249 real-time futást (mean;  $9 \pm 7.02/\text{LNE}$ ) végeztünk specifikus gomba nukleinsav szekvenciák (facC ortológ gének) jelenlétének monitorozására. Az egyes kategóriákba (lázás vs. nem lázas, eset vs. kontrol) sorolt betegekhez rendelt biomarker analízisek számát, a kapott OD, ill. Cq értékek megoszlását, átlagát, standard hibákkal ( $\pm$ SE) leíró statisztikai mutatókat feltüntettük.

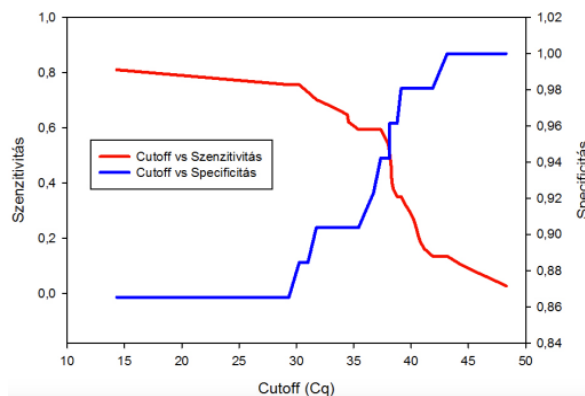
### 8.8.4.1 *Aspergillus* GM és *facC*-PCR cut-off értékeinek számítása

Az eset, ill. a kontrollcsoport mintáinak feldolgozását követően a kapott mérési eredmények alapján optimális cut-off értékeket számoltunk, amelyek alkalmazása esetén a Platelia *Aspergillus* GM-EIA, ill. a *facC*-PCR a legmagasabb specificitási és szenzitivitási mutatók mellett dolgoznának (22/a, 22/b ábrák).



**22/a ábra. Optimális cut-off OD meghatározása Platelia *Aspergillus* GM enzim immunoesszé esetén.**

$OD_{450/620} = 0,275$  döntési szinten a szenzitivitás (Se) = 0,68 (95% CI: 0,4650-0,8505), specificitás (Sp) = 0,7472 (95% CI: 0,4045-0,6844). Valószínűségi hányadosok;  $LR^+ = 2,3133$  és  $LR^- = 0,6562$ .



**22/b ábra. Optimális cut-off Cp meghatározása *facC*-PCR esetén.**

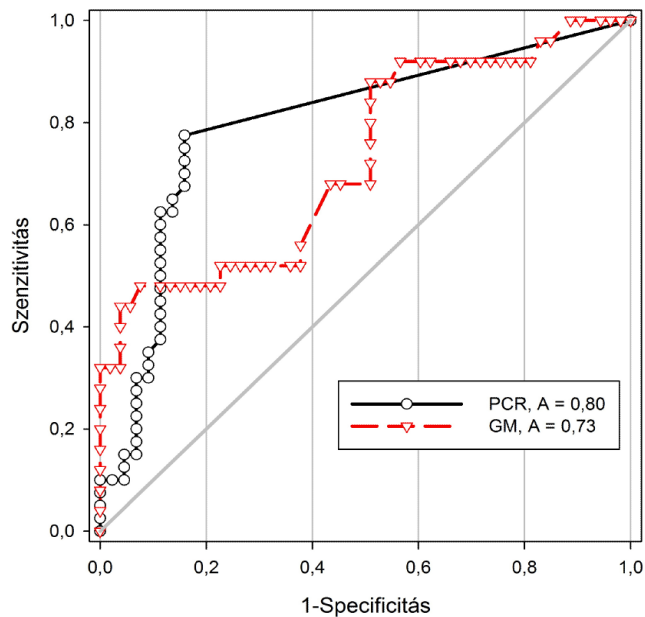
$C_p = 38,69$  döntési szinten a szenzitivitás (Se) = 0,5676 (95% CI: 0,3949-0,7290), specificitás (Sp) = 0,9423 (95% CI: 0,8405-0,9879). Valószínűségi hányadosok;  $LR^+ = 9,8371$  és  $LR^- = 0,4589$ .

Méréseink alapján a Platelia *Aspergillus* GM enzim immunoesszéhez kalkulált optimális cut-off OD index ( $OD_{450/620} \geq 0.275$ ) lényegesen alacsonyabb volt annál, amelyet a rutin diagnosztikában az előírás szerint alkalmaznak ( $OD_{450/620} \geq 0.5$ ).

Ennek okát elsősorban a diagnosztikai mutatók torzulásában kereshetjük, amely kis mintaszám esetén a nem reprezentatív mintavételezés eredménye. Fontos azonban megemlíteni, hogy az *Aspergillus* GM-EIA  $OD_{450/620} \geq 0.5$ -nél alacsonyabb cut-off OD-je esetén fennállhat a veszélye a fals-positívok igen magas arányának. Elég csak azt figyelembe venni, hogy számos élelmiszer, vagy esetleg bizonyos antibiotikumok használata jelentősen emelheti a nem aszpergillózisos betegek szérum GM szintjét.

### 8.8.4.2 *Aspergillus* GM és *facC*-PCR diagnosztikai pontossága

ROC (receiver operating characteristic curves) analízist végeztünk és görbe alatti területet (AUC) számoltunk (23. ábra) mindkét diszkriminátorhoz (Platelia *Aspergillus*-EIA és *facC*-PCR). A görbe alatti területek mérőszámai, a szerológiai Platelia *Aspergillus* GM-EIA módszer esetében „megfelelő” 0.7283 (95% CI 0.6031-0.8535);  $P$  érték  $< 0.0012 \pm 0.0639$ , míg a *facC*-PCR teszt esetében „jelentős” 0.8004 (95% CI 0.6976-0.9031);  $P$  érték  $< 0.0001 \pm 0.05243$  diagnosztikai pontosságra utalnak.



**23. ábra. ROC görbék és az AUC az *Aspergillus* GM-EIA szerológia, ill. a *facC*-PCR módszer diagnosztikai hatékonyságának illusztrálására.**

Görbe alatti területet számoltunk az egyes diszkriminátorok - GM-EIA (fekete pontozott ROC görbe) és a *facC*-PCR (piros fordított háromszögekkel megrajzolt ROC görbe) - diagnosztikai hatékonyságának megállapítására a módszerek különböző döntési tartományainál (OD 0.017-5.45 és  $C_p$  19.98-48.35) mért valós pozitívoknak (y tengelyen szenzitivitás értékek) a fals-pozitívok (1-specificitás értékek az x tengelyen) függvényében való ábrázolásával.

### 8.8.4.3 *Aspergillus* GM és *facC*-PCR diagnosztikai hatékonysága

Diagnosztikai hatékonysági mutatókat; szenzitivitás (Se), specificitás (Sp), valószínűségi hányadosokat ( $LR^+$ ,  $LR^-$ ), prediktív értékeket ( $PV^+$ ,  $PV^-$ ) és esélyhányadost (DOR) számoltunk a Platelia *Aspergillus* GM-EIA szerológia és *facC*-PCR tesztekre (20. táblázat).

**20. táblázat. Szenzitivitás, specificitás, valószínűségi hányadosok, prediktív értékek és az esélyhányadosok alakulása az *Aspergillus* GM-EIA és a *facC*-PCR esetén.**

Vizsgált paraméter	Platelia <i>Aspergillus</i> -EIA	<i>facC</i> -PCR
% Se (95% CI)	52.63 (28.90-75.51)	69.23 (48.21-85.63)
% Sp (95% CI)	98,31 (90.88-99.72)	68.85 (55.71-80.09)
$LR^+$	31,05	2.22
$LR^-$	0.48	0.45
$PV^+$ %	90.91	48.65
$PV^-$ %	86.57	84.00
DOR (95% CI) <i>P</i> érték < 0.0001	64.44 (7.342-565.694)	4.974 (1.81-13.434) <i>P</i> érték < 0.0001

Platelia *Aspergillus* GM enzim immunoesszé (cut-off  $OD_{450/620} \geq 0.5$ ) ill. a *facC*-PCR (pozitivitás  $\geq 1$  pozitív Cq / három párhuzamos real-time reakció) tesztek diagnosztikai hatékonysági mutatói standard cut-off szinteken. Rövidítések: (Se) szenzitivitás, (Sp) specificitás, (95% CI) 95% megbízhatósági tartomány, ( $LR^+$ ,  $LR^-$ ) valószínűségi hányadosok, (DOR) esélyhányados, ( $PV^+$ ,  $PV^-$ ) prediktív értékek.

### 8.8.5 Kombinált biológiai marker-monitorozások eredményei

#### 8.8.5.1 Minta konkordancia

Cohen féle kappa-statisztikát végeztünk a kétféle diszkriminátor (Platelia *Aspergillus* GM-EIA ill. *facC*-PCR) eredmények konkordanciájának a vizsgálatára. A 27 epizód egy éves nyomonkövetése során 77 alkalommal volt lehetőségünk kombinált biomarker analízist végezni. Ezen esetekben az *Aspergillus* GM-szerológiával együtt szimultán el tudtuk végezni a real-time analíziseket is és így a kappa statisztikához a kapott eredményeket párba tudtuk rendezni. Ennek megfelelően a kappa index értéke ( $K = 0.258$ ), amely a két vizsgált diszkriminátor eredményeinek mérsékelt egyezését mutatta.

### 8.8.5.2 Diagnosztikai hatékonyság

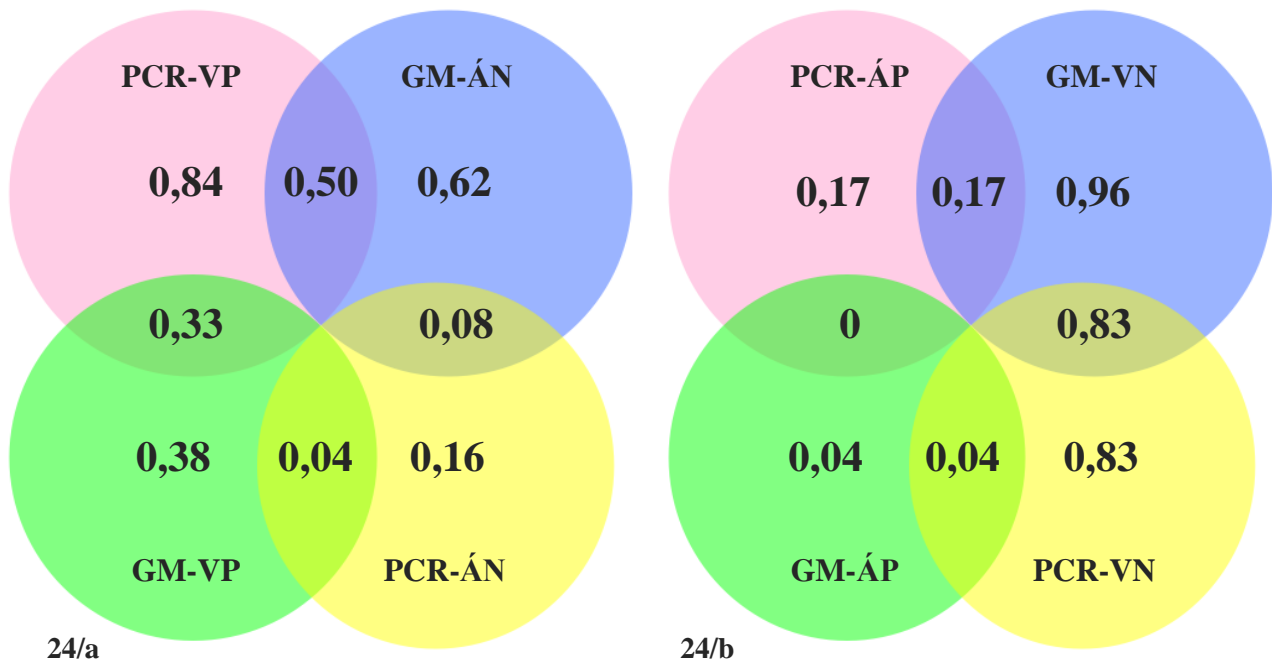
A kontrollcsoport szérum mintáit vizsgálva a Platelia *Aspergillus* GM-EIA teszt magas, 96%-os specificitást mutatott (24/b ábra). Mindössze két epizód szérum mintáit vizsgálva mértünk  $OD_{450/620} \geq 0,5$  határérték feletti magas GM szérum szinteket (GM-ÁP-ok), amelyek esetén nem merült fel invazív aszpergillózis gyanúja (EORTC/MSG kritériumrendszere alapján kontrollcsoportba sorolt betegek). Ebből az következik, hogy az esetek 4%-ában fals pozitív eredményeket mutatott. Ezzel szemben az *Aspergillus* GM-EIA teszt az eset csoport szérum mintáinak 62%-ában nem volt képes határérték feletti  $OD_{450/620}$  értékeket mérni (GM-ÁN-ok), így a módszer szenzitivitása csak 38%-nak adódott (24/a ábra).

A *facC*-PCR az eset csoport (bizonyított, valószínű ITA) szérum mintáinak 84%-ában volt képes az *Aspergillus fumigatus* specifikus nukleinsav target molekulák (*Streptomyces* eredetű *facC* ortológ gének) jelenlétének specifikus detektálására (pozitivitás  $\geq 1$  pozitív Cq/három párhuzamos real-time reakció). Ebből az következik, hogy a *facC*-PCR módszer az esetek 16%-ában mutatott fals eredményeket (PCR-ÁN) (24/a ábra). A *facC*-PCR módszer specificitását illetően megállapítható, hogy az esetek 83%-ában helyesen azonosította (PCR-VN) a kontrollcsoport mintáit. Ebből következik azonban, hogy az analízisek fennmaradó 17%-ban ál-pozitív (PCR-ÁP) eredményeket mutatott (24/b ábra).

Az *Aspergillus* GM-EIA ill. a *facC*-PCR módszerek diagnosztikai hatékonyságának összehasonlító analíziséhez a Venn-diagramok (24. ábra) halmazainak metszeteit vizsgáltuk. A szérum mintákhoz rendelt *Aspergillus* GM-EIA ill. *facC*-PCR eredményeket párokba (eset csoportban 24, míg a kontrollcsoportban, 53 esetben) rendeztük és azokat együtt vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy amíg a *facC*-PCR az eset csoport szérum mintáinak 50%-át képes volt azonosítani, addig azokat az *Aspergillus* GM-EIA elmulasztotta detektálni. Ezzel szemben viszont a *facC*-PCR módszer csak az esetek 4%-ában a nem volt képes az eset csoport mintáit pozitívnak azonosítani. Illetve, az eset csoport szérum mintáinak 8%-át egyik módszer sem volt képes valós pozitívként azonosítani és a kombinált diagnózis során a két diagnosztikai módszer az eset csoport mintáinak mindösszesen csak 33%-ában volt képes konkordáns, pozitív eredményeket mutatni. A kontroll minták 17% és 4%-ában a módszerek ellentmondó eredményeket mutattak az előbbi esetben az *Aspergillus* GM-EIA, míg az utóbbi esetben a *facC*-PCR javára. Említésre méltó azonban, hogy míg a kontroll minták 83%-a negatív maradt mindkét diszkriminátor esetében, addig egyetlen olyan kontroll minta sem akadt, amelyet mind az *Aspergillus* GM-EIA mind pedig a *facC*-PCR ál pozitívként azonosítottak volna.

Eset (bizonyított/valószínű ITA) csoport

Kontroll (nem bizonyított ITA) csoport



24. ábra. Venn-diagrammok *Platelia Aspergillus* GM-EIA és *facC*-PCR kombinált vizsgálatára.

(VP), valós pozitív; (ÁN), ál-negatív; (VN), valós negatív; (ÁP), ál-pozitív. Eset csoport (bizonyított és valószínű ITA) szérumból mintáinak analízisét követően kapott pozitív *Aspergillus* GM-EIA, ill. *facC*-PCR eredményeket valós pozitívnak (VP) míg ugyanezen csoport szérumból mintáinak negatív eredményeit ál-negatívoknak (ÁN) tekintjük. Kontrollcsoport (EORTC/MSG kritériumok szerint nem bizonyított IA kategóriába sorolt) szérumból mintáinak analízisével kapott negatív GM-EIA indexek és *facC*-PCR eredményeket valós negatívnak (VN) míg a pozitívokat ál pozitívként aposztrofáljuk (ÁP). **24/a ábra.** Az eset csoport (bizonyított/valószínű) szérumból mintáinak 84%-a (27/32) és 38%-a (9/24) bizonyult valós pozitívnak (VP) *facC*-PCR és GM-ELISA tesztekkel vizsgálva. Ennek megfelelően az *Aspergillus* GM-EIA az eset csoport 62%-ában (15/24), míg a *facC*-PCR az esetek 16%-ában (5/32) mulasztotta el a valós pozitívok azonosítását. **Metszet analízis:** az eset csoport szérumból mintáinak párba rendezését követően, az eset csoport mintáinak 33%-a (8/24) valós pozitívnak (VP), 8%-a pedig (2/24) ál-negatívnak (ÁN) bizonyult mindkét diszkriminátorral vizsgálva. Mindössze egyetlen olyan esetből származó szérumból minta akadt a 24-ből, amelyet egyik diszkriminátor (*facC*-PCR ill. *Aspergillus* GM-EIA) sem detektált pozitívnak. Ezzel szemben a párba rendezett eset minták analízisének 50%-ában (12/24) csak a *facC*-PCR módszernek sikerült a vizsgált szérumból mintákat pozitívnak azonosítani. **24/b ábra.** A kontrollcsoport (nem bizonyított kategóriába sorolt epizódok, akiknél nem merült fel az ITA gyanúja) szérumból mintáinak 96%-a (51/53) ill. 83%-a (44/53) lett valós negatív (VN). A kontroll minták 4%-a (2/53), ill. 17%-a (9/53) bizonyult ál pozitívnak *Aspergillus* GM-EIA, ill. *facC*-PCR módszerekkel vizsgálva. **Metszet analízis:** a kontroll minták 83%-a (44/53) negatív volt mindkét teszt esetében és egyetlen olyan kontroll minta sem akadt, amelyet mind az *Aspergillus* GM-EIA mind pedig a *facC*-PCR ál pozitívként azonosítottak volna. A kontroll csoport mintáinak párba rendezését követően 4%-uk (2/53), ill. 17%-uk (9/53) esetében volt ellentmondás a *facC*-PCR, ill. az *Aspergillus* GM-EIA javára.

### 8.8.6 Túlélési ráták

Eset-kontroll tanulmányunk teljes túlélési rátája 48.15% volt (25. ábra). A 27 vizsgált betegből 13 halálozott el a nyomonkövetési periódus időszaka során, 4 eset (30.77%) és 9 kontroll (69.23%). A 23 GM-EIA negatív beteg 43,47%-a (10 epizód: ID-4, -9, -11, -14, -15, -17, -18, -19, -22, -24), míg a 4 GM-EIA pozitív beteg 75%-a (3 epizód: ID-7, -10, -13) halálozott el. A GM-EIA pozitív csoport egyik epizódja (ID-10) esetén a PMH vizsgálat nem volt képes a tüdő szövetében a specifikus, *Aspergillusokra* jellemző (dichotómikus elágazású) hifák jelenlétét igazolni. (25. ábra; ID-10 epizód).



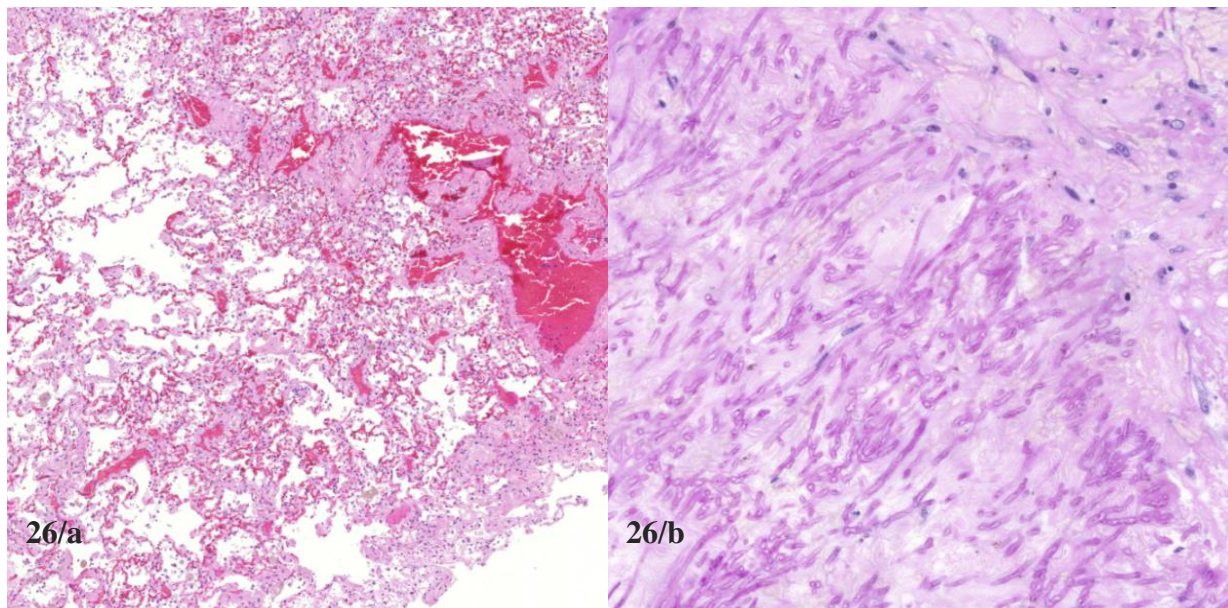
25. ábra. Posztmortem hisztológiai adatok bemutatása.

Rövidítések: (PMH); posztmortem hisztológia. (ITA<sup>+</sup>) Gombainfekcióra utaló jellegzetes dichotómikus hifaelágazások jelenlétének megerősítése a tüdőben (periodic acid-Schiff) PAS, ill. az infekció következtében kialakult tüdő atelektázia kimutatása (hematoxylin-eosin) H&E festéssel. (ITA<sup>-</sup>) *Aspergillus* eredetű gombainfekció megerősítésének a hiánya. A fekete szimbólumok a kontroll, míg a piros piktogramok az eset csoport tagjait jelölik. Kontúrozott szimbólumok azon epizódokat jelölik, amelyek jól reagáltak az antibiotikum kezelésre (II. csoport), míg a beszínezett szimbólumok azon epizódokra utalnak, amelyek esetében megmaradt a láz (I. csoport). Az átlagosnál kisebb piktogramok a gyerekekre utalnak. A szimbólumok alatt elhelyezkedő számok pedig a betegek azonosító számait (ID) mutatják.

## 8.9 Három esettanulmány

Három beteg esetében mutatkozott jelentős ellentmondás a PMH adatok, ill. a klinikai vizsgálatok eredményei között. Az elhunyt betegek 53.85%-ában (7/13) végeztek PMH vizsgálatot.

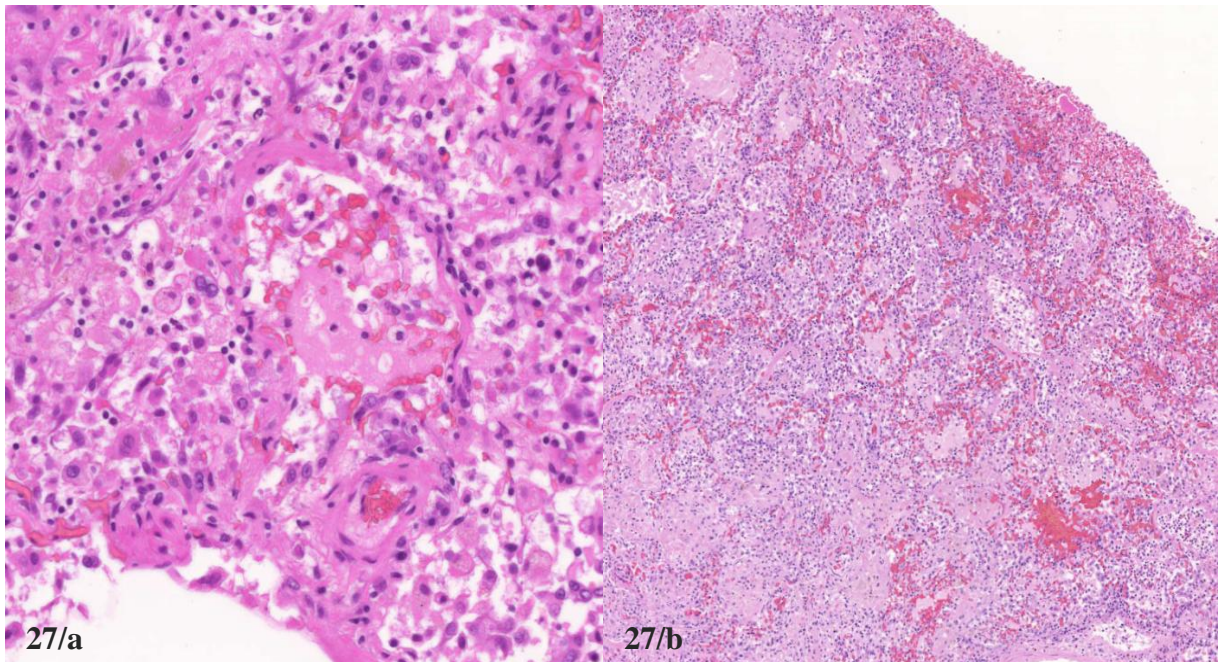
- ❖ Az autopszia csak egyetlen esetben (26. ábra, ID-4 epizód) volt képes igazolni a tüdő szövetében tenyésző *Aspergillus* gombák jelenlétét. Az ID-4 epizódot a klinikus az EORTC/MSG kritériumrendszerben leírtaknak megfelelően eredetileg kontroll (nem bizonyított ITA) csoportba sorolta (a beteg jól reagált az antibiotikum kezelésre, negatív lett a CT vizsgálat eredménye, és mind a 7 GM-EIA szerológiai tesztjének eredménye negatív volt), ám halálát követően a PMH egyértelműen igazolta a tüdejében az *Aspergillus*okra jellemző dichotomikus hifa elágazásokat így az ID-4 epizód, utólagos korrekciót követően átkerült az eset csoportba. Az ID-4 epizód esetében azért kértük a patológus kollégákat a tüdő PMH analízis elvégzésére, mert a kombinált biomarker monitorozás és a közel fél éves nyomonkövetés során a 11 *facC*-PCR teszt eredményei egyetlen kivétellel pozitívnak bizonyultak, míg ezzel szemben az ez alatt az időszak alatt összegyűlt GM-szerológia eredményei konzekvensen negatívak maradtak, alacsony OD<sub>450/620</sub> indexekkel (OD<sub>450/620</sub> értékek átlaga = 0,27).



**26. ábra. ID-4 epizód posztmortem hisztológiai (PMH) vizsgálatának eredményei.**

26/a ábra. tüdő atelektázia és pangó tüdő *Aspergillus* infekció következtében (x10 nagyítás, H&E festés). 26/b ábra. *Aspergillus* hifák PAS festése (x40 nagyítás).

- ❖ Az ID-24 beteget az antibiotikumra nem reagáló láz, pozitív CT, negatív *Aspergillus*-GM szerológia (és ugyancsak negatív *facC*-PCR eredményekkel) és negatív BAL eredményekkel eredetileg az eset (valószínű ITA) csoportba sorolta a klinikus. A posztmortem hisztológiai vizsgálat azonban nem tudta megerősíteni a tüdőben tenyésztő *Aspergillus* hifák jelenlétét. Ezt az epizódot végül ugyancsak átkategorizálták a kontroll csoportba (27. ábra).



**27. ábra. ID-24 beteg tüdő posztmortem hisztológiai vizsgálatának eredménye.**

A képeken ugyan jól látható a tüdő atelektázia, és az alveoláris sérülések PAS festéssel (27/a ábra 10x, 27/b ábra x40 nagyítás), azonban *Aspergillus* eredetű hifák jelenlétét nem sikerült igazolni.

- ❖ Antibiotikumra nem reagáló láz, *Aspergillus* pozitív BAL tenyészet és a háromból egy pozitív GM-EIA eredmény alapján, az eredetileg eset csoportba (valószínű ITA) sorolt ID-10 epizódról szintén nem sikerült az autopszia folyamán igazolni a tüdőaszpergillózist, azonban, ennek ellenére a klinikus szakemberek úgy ítélték meg, hogy nem szükséges az átkategorizálás.

## 8.10 Diszkriminátorok diagnosztikai hatékonyságának alakulása az autopszia eredmények ismeretében

Az ID-4, ill. ID-24-es azonosító számú betegek átkategorizálását követően változtak a diszkriminátorok diagnosztikai hatékonysági mutatói. A megváltozott statisztikai mutatókat a 21. táblázat-ban tüntetjük fel (vesd össze a 20. táblázattal).

**21. táblázat. Statisztikai mutatók alakulása a betegek posztmortem hisztológiai eredményeinek függvényében, az ID-4, ill. ID-24-es azonosító számú epizódok átkategorizálását követően.**

Paraméter	Platelia <i>Aspergillus</i> -EIA	<i>facC</i> -PCR
% Se (95% CI)	38 (17,97-57,48)	84 (65,46-93,19)
% Sp (95% CI)	96 (87,02-99,54)	83,02 (70,19-91,91)
LR <sup>+</sup>	9,5491	4,85
LR <sup>-</sup>	0,6651	0,21
PV <sup>+</sup> %	89,4268	75,68
PV <sup>-</sup> %	62,9298	88,00
DOR (95% CI)	15,33 (3,117-75,420)	28,667 (9,048-90,823)
<i>P</i> érték	<i>P</i> <0,0001	<i>P</i> érték < 0,0001

*Platelia Aspergillus* GM enzim immunoesszé (cut-off OD<sub>450/620</sub> ≥ 0.5) ill. a *facC*-PCR (pozitivitás ≥ 1 pozitív Cq / három párhuzamos real-time futás) tesztek diagnosztikai hatékonysági mutatói standard cut-off szinteken. (Se) szenzitivitás, (Sp) specificitás, (95% CI) 95% megbízhatósági tartomány, (LR<sup>+</sup>, LR<sup>-</sup>) valószínűségi hányados, (DOR) esélyhányados, (PV<sup>+</sup>, PV<sup>-</sup>) prediktív értékek. Rövidítések: (Se) szenzitivitás, (Sp) specificitás, (95% CI) 95% megbízhatósági tartomány, (LR<sup>+</sup>, LR<sup>-</sup>) valószínűségi hányadosok, (DOR) esélyhányados, (PV<sup>+</sup>, PV<sup>-</sup>) prediktív értékek.

## 9. NEMZETKÖZI SZEREP

### 9.1 ISHAM-EAPCRI tagság

Munkacsoportunk 2013. január óta tagja az ISHAM-EAPCRI szervezet laboratóriumi munkacsoportjának, amely nemzetközi, több centrumot átfogó körkontrollos vizsgálatokkal kívánja elősegíteni a hatékony gomba DNS izoláló módszerek, kidolgozását, optimalizálását, a házi-fejlesztésű ("home-brew") esszék analitikai szenzitivitásának meghatározását, és így a nukleinsav alapú diagnosztikai tesztek standardizációját.

### 9.2 ISHAM-EAPCRI 2014-es BAL panel vizsgálatának eredményei

A 2014-es év *Aspergillus fumigatus* konídium, ill. gDNS tartalmú BAL paneljeiből munkacsoportunk egyszerre kettőt is kapott (BAL panel-D1 és BAL panel-D2). Az elkészített BAL paneleket rajtunk kívül még további 26 másik munkacsoport (összesen 27 résztvevő) vizsgálta (5.7 fejezet).

A BAL panelek (BAL panel-D1/D2) feldolgozását követően mind a 36 teljes adatsor (lásd 28-31. ábrák) eredményei visszajutottak az ISHAM-EAPCRI statisztikai munkacsoporthoz ahol azokat kiértékeltek. A 2014 évi körkontrollos vizsgálat fő célja az egyes, "in-house" nukleinsav izoláló módszerek hatékonyságának, ill. a különböző *home-brew* real-time PCR *Aspergillus* diagnosztikai rendszerek analitikai szenzitivitásának meghatározása volt BAL mintákon.

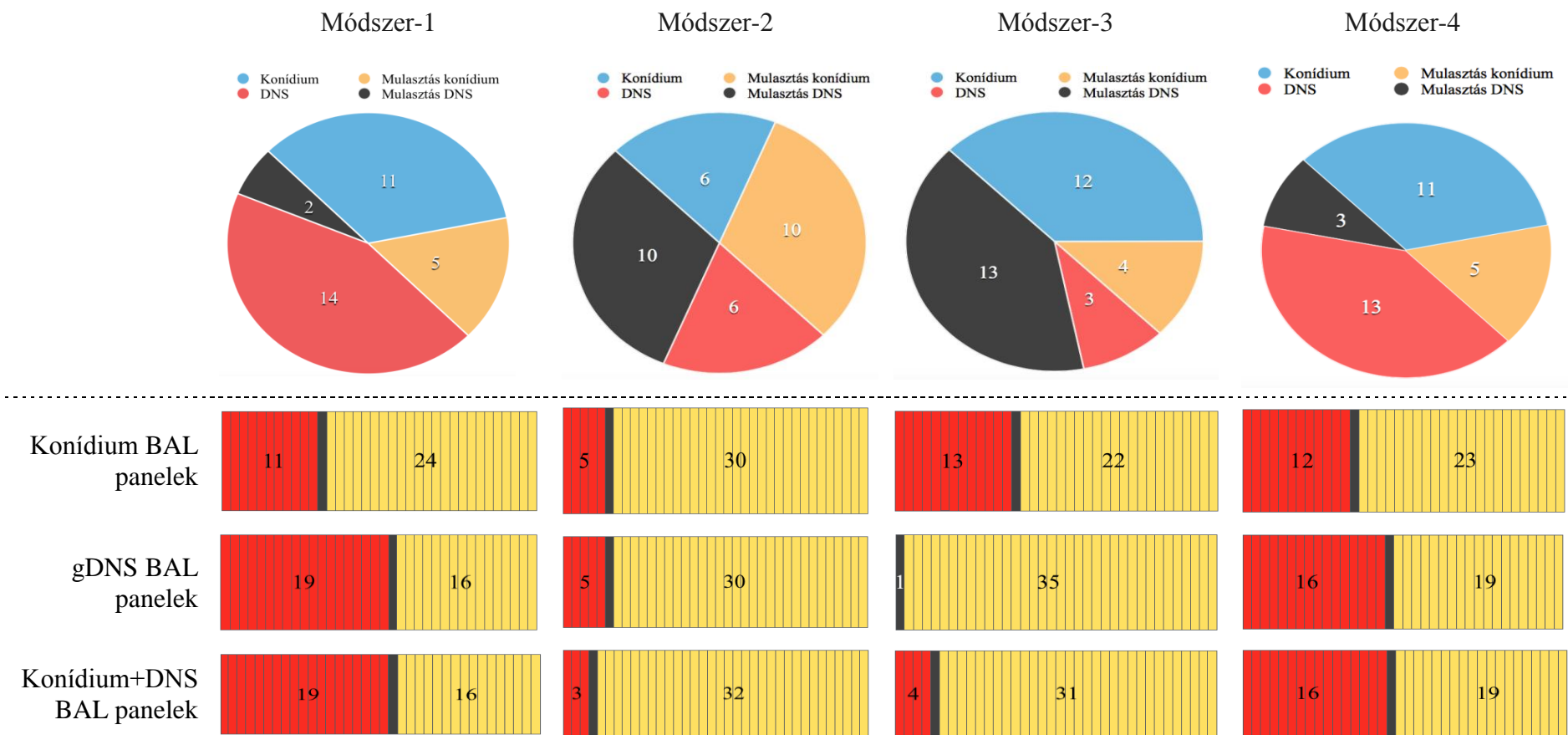
A panelek feldolgozása során mind a konídium, mind pedig a gDNS jelenlétével egyaránt számolnunk kellett, így fontos volt annak a vizsgálat, hogy képes-e adott "in-house" módszer mindkettő hatékony kinyerésére a biológiai mintából úgy, hogy pl. a mechanikus lízis során ne roncsolódjon túlságosan a gDNS.

A 2014-es BAL panel paneleken végzett analíziseink nyers eredményeit a 22. táblázatban tüntettük fel. Az *Aspergillus fumigatus* tartalmú BAL panelek analízisét követően a négy, általunk vizsgált módszerek közül a módszer-4 rendelkezett a legalacsonyabb detektációs küszöbvel. A LoD-ja mind az *Aspergillus fumigatus* konídium, mind pedig a gDNS tartalmú paneleken 1 GE-nek felelt meg. Annak ellenére, hogy mind a két negatív kontroll mintát falszpozitívnak azonosította, a megfelelő izolációs és PCR negatív kontrollok negatívak maradtak.

**22. táblázat. *Aspergillus fumigatus* konídium és gDNS tartalmú BAL paneleink feldolgozását követően kapott nyers eredmények bemutatása módszer-1, módszer-2, módszer-3, módszer-4 esetén.**

Minta ID	<i>Aspergillus fumigatus</i> target jellege	DNS mennyiség / 500 µl BAL	Detektálás fontossága	Átlagos pozitivitás (%)	Módszer-1 (Pont)	Módszer-2 (Pont)	Módszer-3 (Pont)	Módszer-4 (Pont)
1	Negatív kontroll	0 GE	Alapvető fontosságú	9,4	Negatív (3/3)	Negatív (3/3)	Negatív (3/3)	Pozitív (0/3)
2	<i>A. fumigatus</i> gDNS	50 GE	Alapvető fontosságú	73,6	Pozitív (3/3)	Negatív (0/3)	Negatív (0/3)	Pozitív (3/3)
3	<i>A. fumigatus</i> gDNS	10 GE	Alapvető fontosságú	60,4	Pozitív (3/3)	Negatív (0/3)	Negatív (0/3)	Pozitív (3/3)
4	<i>A. fumigatus</i> gDNS	5 GE	Lényeges	50,9	Pozitív (2/2)	Negatív (0/2)	Negatív (0/2)	Pozitív (2/2)
5	<i>A. fumigatus</i> gDNS	1 GE	Lényeges	32,1	Negatív (0/2)	Negatív (0/2)	Negatív (0/2)	Pozitív (2/2)
6	<i>A. fumigatus</i> gDNS	100 GE	Alapvető fontosságú	83,0	Pozitív (3/3)	Pozitív (3/3)	Negatív (0/3)	Pozitív (3/3)
7	<i>A. fumigatus</i> konídium	5 GE	Lényeges	43,4	Pozitív (2/2)	Negatív (0/2)	Negatív (0/2)	Negatív (0/2)
8	<i>A. fumigatus</i> konídium	50 GE	Alapvető fontosságú	90,6	Pozitív (3/3)	Negatív (0/3)	Pozitív (3/3)	Pozitív (3/3)
9	<i>A. fumigatus</i> konídium	1 GE	Lényeges	24,5	Negatív (0/2)	Negatív (0/2)	Negatív (0/2)	Pozitív (2/2)
10	<i>A. fumigatus</i> konídium	10 GE	Alapvető fontosságú	67,9	Negatív (0/3)	Negatív (0/3)	Pozitív (3/3)	Pozitív (3/3)
11	<i>A. fumigatus</i> konídium	100 GE	Alapvető fontosságú	88,7	Pozitív (3/3)	Pozitív (3/3)	Pozitív (3/3)	Pozitív (3/3)
12	Negatív kontroll	0 GE	Alapvető fontosságú	20,8	Negatív (3/3)	Negatív (3/3)	Negatív (3/3)	Pozitív (0/3)
összesen					25	12	15	24

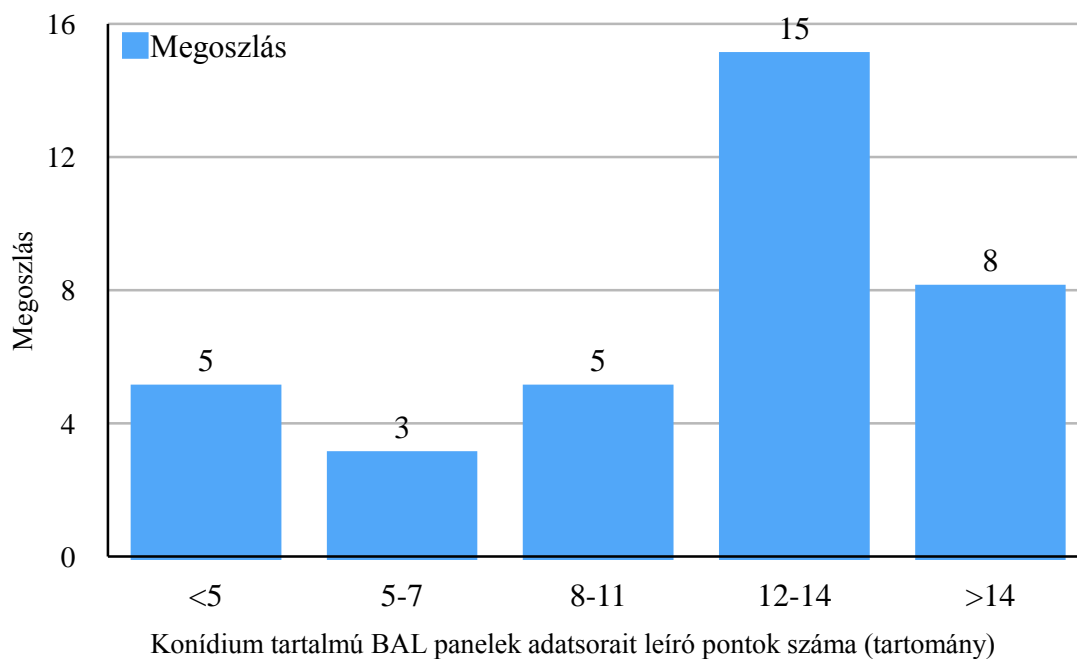
*Aspergillus fumigatus* konídium, illetve a gDNS panelek analízisével kapott eredményeinket összegezvén megállapítható volt (31. ábra), hogy vizsgált módszereink közül a legmagasabb pontot az általunk optimalizált, kerámiagyöngyös-mechanikai lízisen és LC 2.0 kapilláris detektáláson alapuló módszer-1 (25 pont az összesen kapható 32-ből) kapta. Az egyes módszerek által elért pontok megoszlását, ill. ennek megfelelően nemzetközi mezőnyben elfoglalt helyüket a 28. ábra mutatja.



**28. ábra. Módszerek diagnosztikai ereje különböző BAL paneleken és a nemzetközi mezőnyben elfoglalt helyük a 35 további munkacsoport által elért eredmények alapján.**

Módszer-1, módszer-2, módszer-3 és módszer-4 *Aspergillus fumigatus* konídium és gDNS tartalmú BAL panelek analízisét követően a kapott pontok és a mulasztások alakulását az ábra felső részén található kördiagramok egyes színekkel szemléltetik. Az ábra alsó részén pedig a laboratóriumi munkacsoport tagjai (összesen 27 résztvevő) által visszaszolgáltatót adatsorok (összesen 36 db) pontjainak egymáshoz való viszonyát mutatjuk. Minden esetben összesen 36 darab, piros, szürke, ill. sárga színnel jelölt sávot tüntettünk fel. Piros színű sávokkal jelöltük azon adatsorokat, amelyek kevesebb pontot értek el az általunk alkalmazott módszer pontjainál, míg sárga színű sávokkal azon adatsorokat jelöljük, amelyek legalább annyit, vagy többet értek el, mint amennyit az általunk alkalmazott egyes módszerek kaptak. Az egy darab szürke sáv, minden esetben az általunk alkalmazott módszer diagnosztikai erejét mutatja a BAL panelek analízisét követően kapott pontjai alapján.

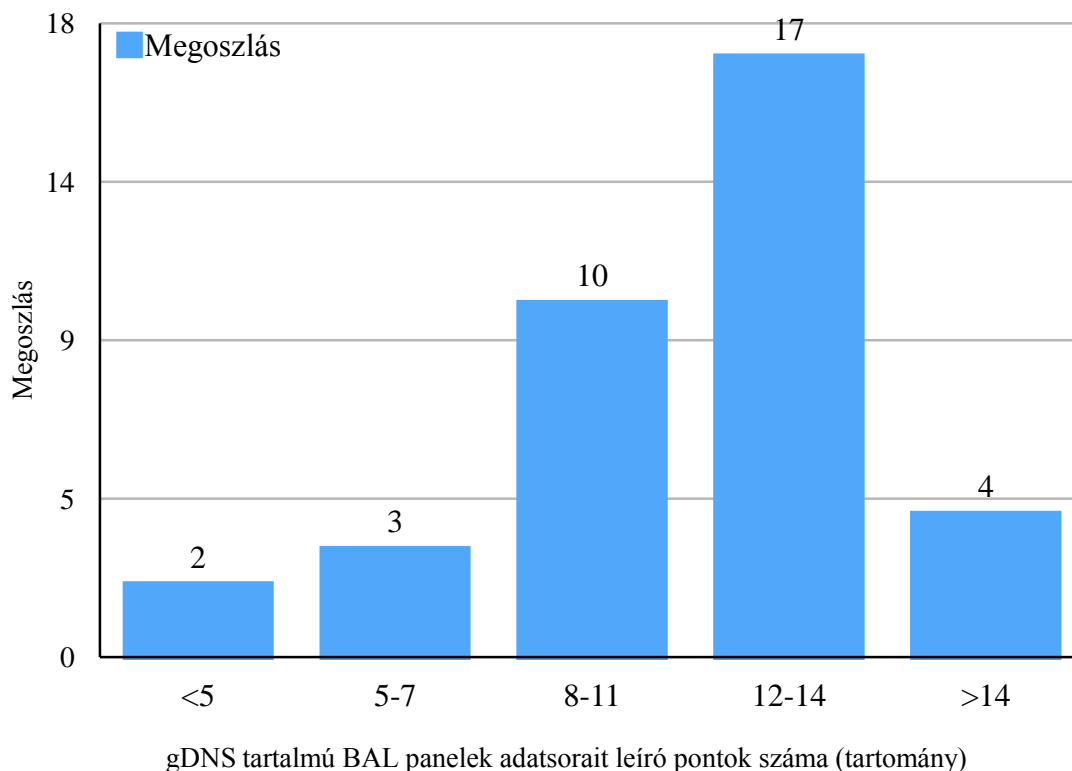
A BAL panelek *Aspergillus fumigatus* konídium tartalom analizisének eredményeit követően a **módszer-1** 11 pontot kapott a 16-ból, ezt az adatsorok 69,4%-a (25/36) volt képes elérni, vagy meghaladni (28. ábra), így ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy a 8-11 pontot elért adatsorok közül még egyetlen adatsor kapott rajtunk kívül 11 pontot (29. ábra). A módszer-1 LoD-ja *Aspergillus fumigatus* konídium tartalmú BAL panel-D1-en 5 GE. A **módszer-2** mindösszesen csak 6 pontot kapott a 16-ból, amelyet más adatsorok 86,1%-a (31/36) érte el, vagy haladta meg (28. ábra), azaz az 5-7 pontot elérték közül további kettő kapott még 6 pontot vagy annál többet (29. ábra). A módszer-2 LoD-ja *Aspergillus fumigatus* konídium tartalmú BAL panel-D1-en 100 GE. A **módszer-3** 12 pontot ért el a 16-ból, ezt az adatsorok 63,9%-a (23/36) volt képes elérni, vagy meghaladni (28. ábra), így a kategóriában ezt mind a további 14 másik módszer ugyancsak elérte, vagy meghaladta (29. ábra). A módszer-3 LoD-ja *Aspergillus fumigatus* konídium tartalmú BAL panel-D1-en 10 GE. A **módszer-4** 11 pontot ért el a 16-ból, amelyet a további adatsorok 66,6%-a (24/36) ugyancsak elérte, vagy meghaladta (28. ábra), továbbá ebben a kategóriában nem volt olyan módszer, amely ennél több pontot kapott volna (29. ábra). A módszer-4 LoD-ja *Aspergillus fumigatus* konídium tartalmú BAL panel-D2-n 1 GE.



**29. ábra.** BAL panelek *Aspergillus fumigatus* konídium detektáló módszereink (módszer-1, -2, -3, -4), ill. a további 26 munkacsoport 32 módszerének analizisével kapott, 36 teljes adatsor pontjainak megoszlása.

A kék színnel jelzett oszlopdigramok alján feltüntetett számok az egyes tartományokba sorolt adatsorok számára utalnak.

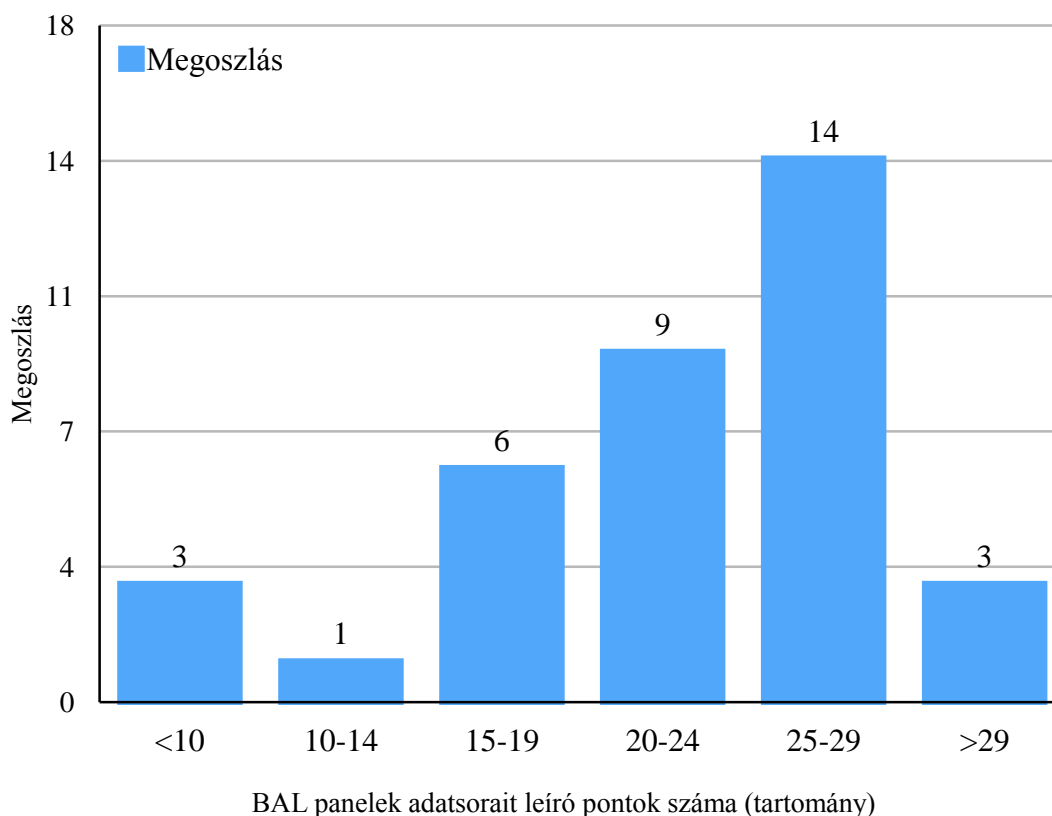
A BAL panelek *Aspergillus fumigatus* gDNS tartalom analizisének eredményeit követően a **módszer-1** 14 pontot kapott a 16-ból, ezt az adatsorok 47,2%-a (17/36) érte el, vagy haladta meg (28. ábra), azaz a 12-14 pontot elért adatsorok közül további nyolc kapott még a módszer-1 kivételével 14 pontot (30. ábra). A módszer-1 LoD-ja *Aspergillus fumigatus* gDNS tartalmú BAL panel-D1-en 5 GE. A **módszer-2** 6 pontot kapott a 16-ból, amelyet más adatsorok 86,1%-a (31/36) volt képes elérni, vagy meghaladni (28. ábra) amelynél az 5-7 pontos kategóriába sorolt két másik adatsor sem kapott kevesebbet (30. ábra). A módszer-2 LoD-ja *Aspergillus fumigatus* gDNS tartalmú BAL panel-D1-en 100 GE. A **módszer-3** 3 pontot ért el a 16-ból, amelynél minden más adatsor jobban teljesített (28., 30. ábrák). A módszer-3 LoD-ja *Aspergillus fumigatus* gDNS tartalmú BAL panel-D1-en nem volt megállapítható. A **módszer-4** 13 pontot ért el a 16-ból, ezt az adatsorok 55,6%-a (20/36) ugyancsak elérte, vagy meghaladta (28. ábra) és nem volt a kategóriában olyan adatsor, amely 12 pontot kapott volna (30. ábra). A módszer-4 LoD-ja *Aspergillus fumigatus* gDNS tartalmú BAL panel-D2-n 1 GE.



**30. ábra.** BAL panelek *Aspergillus fumigatus* genomi DNS-t detektáló módszereink (módszer-1, -2, -3, -4), ill. a további 26 munkacsoport 32 módszerének analizisével kapott, 36 teljes adatsor pontjainak megoszlása.

A kék színnel jelzett oszlopdiaagramok alján feltüntetett számok az egyes tartományokba sorolt adatsorok számára utalnak.

Összegezvén, a BAL panelek *Aspergillus fumigatus* konídium és nukleinsav (gDNS) analízisét és a kapott eredmények kiértékelését követően a **módszer-1** 25 pontot ért el a 32-ből, amelyet a további adatsorok 47,2%-a (17/36) érték el, vagy haladták meg (28. ábra) és amelynél a kategórián belül nem volt egy olyan módszer sem, amely ennél kevesebb pontot kapott volna (31. ábra). A **módszer-2** kategóriájában 12 pontot kapott a 32-ből (31. ábra), amelyet így a további adatsorok 91,6%-a (33/36) érte el, vagy haladta meg (28. ábra). A **módszer-3** 15 pontot ért el a 32-ből, ezt az adatsorok 88,9%-a (32/36) érte el, vagy haladta meg (28. ábra), amelynél kategóriájában minden adatsor jobban teljesített (31. ábra). A **módszer-4** 24 pontot ért el a 32-ből, és így ezt az adatsorok 55,6%-a (20/36) ugyancsak elérte, vagy meghaladta (28. ábra), továbbá ebben a kategóriában csak két másik adatsor kapott még ilyen pontot (31. ábra).



**31. ábra.** BAL panelek *Aspergillus fumigatus* konídium és genomi DNS-t detektáló módszereink (módszer-1, -2, -3, -4), ill. a további 26 munkacsoport 32 módszerének analízisével kapott, 36 teljes adatsor pontjainak megoszlása.

A kék színnel jelzett oszlopdiaagramok alján feltüntetett számok az egyes tartományokba sorolt adatsorok számára utalnak.

## 10. MEGBESZÉLÉS

A dolgozat témájának alapjául azon felfedezés szolgált, mely szerint **prokarióta eredetű, *facC* ortológ gének kerülhettek át horizontális géntranszferrel, apatogén, fonalas *Streptomyces* baktériumok genomjából bizonyos eukarióta, humánpatogén, fonalas, *Aspergillus* gombákba.** A horizontális géntranszferre lehetőséget az teremtett, hogy a romló, rothadó szerves maradványokon tenyésző, szaprofita *Streptomyces*-eknek és *Aspergillus*-oknak közös az ökológiai élőhelyük (Chater és mtsai, 2010; Fitzpatrick, 2012).

- ✚ 1.1, Kísérletesen igazoltuk, hogy **azon humánpatogén gombafajok közül, melyek a legyengült immunrendszerű egyének szervezetében megtelepedni, idővel generalizálódni, majd szisztémás, invazív fertőzéseket kialakítani képesek, így biológiai markereik a vérben megjelenhetnek, *facC* ortológ génekkel csak az *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, ill. ahogy arra munkánk során fény derült, az ugyancsak magas mortalitású, opportunista *Aspergillus lentulus* fajok rendelkeznek.** Ezen gének megfelelően kiválasztott szakaszai közti **szekvencia divergencia mértéke elegendőnek bizonyult ahhoz, hogy olyan specifikus esszéket fejlesszünk, amelyek sem más fajokkal, sem pedig egymással nem adnak keresztreakciót,** lehetőséget teremtve a három említett faj nagyon érzékeny és specifikus, faji szintű azonosítására különböző biológiai (teljes vér, szérum, BAL) mintákból.
- ✚ 1.2, **Nyolc különböző Taqman® real-time, valamint egy HRM esszét fejlesztettünk a különböző *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, ill. *Aspergillus lentulus* izolátumok specifikus és érzékeny detektálására.** Méréseink alapján az *Aspergillus fumigatus* specifikus **Taqman®-LNA3**, ill. az *Aspergillus terreus* specifikus **Taqman®-LNA4 hidrolízis**, ill. a ***facC*-HRM esszénk detektálási küszöb értékei bizonyultak a legalacsonyabbnak (LoD = 1 CFU/GE/ minta) különböző konídium (CFU), ill. gDNS (GE) paneleken.**

A kereskedelmi forgalomban hozzáférhető, ill. az egyes háziilag fejlesztett nukleinsav detektáló, aszpergillózis diagnosztikai esszék legnagyobb része multi-copy target molekulák, legnagyobb részben riboszómális RNS gének (5,8S rDNS, 18S rDNS, 28S rDNS) konzervált vagy variábilis régióhoz (Rogers és mtsai, 2013; Arvanitis és mtsai, 2014), esetleg mitokondriális DNS génekhez (genomonként átlag 12 mitokondrium) tervezett esszék detektálásán alapulnak (Duval és mtsai, 2008). Az ilyen esszék használatakor számolni kell az egyéb, nem *Aspergillus* fajok jelenlétéből adódó keresztreakciókkal.

✚ 2.1, Mérési eredményeink alapján a *facC* specifikus mono-ill. dual-copy Taqman® esszék, annak ellenére, hogy csak egy vagy esetleg két genomi kópiát detektálnak, nem kevésbé érzékenyek az előbb említettektől. **Taqman® esszéink analitikai szenzitivitását, ill. specificitását teszteltük a 2013-as ISHAM-EAPCRI panelen is.** Ez a panel különböző patogén, invazív aszpergillózist vagy candidózist okozó, ill. egyéb gomba gDNS izolátumait tartalmazta változó koncentrációban, nukleáz mentes víz 20 µl-ében. **Eredményeink alapján az *Aspergillus terreus* specifikus Taqman®-LNA4 esszé LoD-értéke nagyon alacsonynak bizonyult.** A PCR reakciókban, 18 fgnyi (1,2 GE) mennyiségben jelen levő *Aspergillus terreus* valamely klinikai izolátumának DNS-ét detektálta, amelyre a körkontrollos vizsgálatban részt vevő centrumok további 45%-a (a többi részt vevő centrum által visszaszolgált 33 adatsorból 15) volt még képes. **A Taqman®-LNA4 esszé specificitása maximális, 100%.** Azonban az *Aspergillus fumigatus* Taqman®-LNA3 esszé elmulasztotta detektálni a PCR amplifikáció alkalmával a reakciótér 20 µl-ében elméletileg, 1,2 GE-nek megfelelő *Aspergillus fumigatus* valamely klinikai izolátumának DNS-ét. Ez azért meglepő, mert saját méréseink alapján a Taqman®-LNA3 dual-copy real-time esszé nem kevésbé érzékeny a single-copy Taqman®-LNA4 esszénél. Elképzelhető, hogy ez a klinikai izolátum már jelentősebb szekvencia divergenciával rendelkezik az általunk, az optimalizálások során használt Af293 típusörzshöz képest, rontván a Taqman®-LNA3 esszé amplifikációs hatékonyságát, vagy a panel összeállításakor mégsem a megfelelő gDNS mennyiség került a hozzánk eljuttatott mintába, esetleg a szállítási, ill. tárolási körülmények nem voltak megfelelőek, bizonyos fokú DNS degradációt eredményezvén.

- ✚ 2.2, Ugyancsak meglepő módon, a Taqman®-LNA3 esszé keresztreagált az *Aspergillus lentulus* valamely klinikai izolátumával. **Mivel az *Aspergillus fumigatus* Taqman®-LNA3 esszé valamely *Aspergillus lentulus* klinikai izolatum gDNS-ét is detektálta, arra a következtetésre jutottunk, hogy annak ellenére, hogy az *Aspergillus lentulus* genom még nincs megszekvenálva, de tartalmazhat *facC* ortológ gént(eket).** Sikeresen amplifikáltunk az *Aspergillus lentulus* genomból, az *Aspergillus fumigatus facC* ortológ génekhez nagyon hasonló és közel azonos méretű (feltételezhetően ugyancsak *facC* ortológ) nukleinsav szakaszokat, amelyeket megszekvenáltattunk és jelenleg is folyamatban van egy olyan, olvadásgörbe analízisen alapuló infektológiai esszé fejlesztése, amellyel képesek lehetünk ugyanazon reakció csövön belül diszkriminálni *Aspergillus fumigatus* ill. *Aspergillus lentulus* fajok, ill. egyéb más (*Aspergillus terreus*, *A. flavus*, *A. niger*), szisztémás mikózist okozó klinikai izolátumok DNS-ei között.
- ✚ 2.3, Előzetes meréseink alapján a ***facC*-HRM esszénk** klinikai mintákon történő validálása jelenleg is folyamatban van, analitikai szenzitivitása *Aspergillus fumigatus*, ill. *Aspergillus lentulus* gDNS tartalmú paneleken vizsgálva; LoD = 1 GE.

Az egyes *Aspergillus lentulus* törzsek megfelelő azonosításának rendkívüli a közegészségügyi jelentősége, ugyanis mind a klinikai, mind pedig a környezeti izolátumok esetében megnövekedett rezisztencia mutatkozik az egyes, az antifungális gyakorlatban egyébként hasznosnak bizonyult és így előszeretettel használt triazol (*itraconazole*, *voriconazole*), polién (*amphotericin-B*) és *echinocandin* típusú (*caspofungin*) antifungális szerek származékaira nézve (Balajee és mtsai, 2004; Yaguchi és mtsai, 2007). A különböző, hematológiai megbetegedésben szenvedő betegcsoportokban pedig az empirikus preventív medicina részeként gyakran alkalmazzák a voriconazol-t elsővonalbeli antifungális ágensként (Slobbe és mtsai, 2008, Walsh és mtsai, 2008). Hatásosnak bizonyulnak azonban ellenük bizonyos *echinocandinok*, mint az *anidulafungin* és a *micafungin* (Swilaiman és mtsai, 2013). Növekedni látszik azon retrospektív tanulmányok száma, amelyek utólag igazolják, hogy a korábban *Aspergillus fumigatus*-ként azonosított kórokozó ágensek egy része valójában *Aspergillus lentulus* (Montenegro és mtsai, 2009; Symoens, 2010).

**A gomba nukleinsav diagnózison alapuló tesztek érzékenységét a biológiai minta jellege, így a nukleinsav extrakció menete (amennyiben szükséges a gombasejtek mechanikai feltárásának hatékonysága) alapvetően befolyásolják.**

A szérum, ill. plazma mintákkal ellentétben kizárólag teljes vér, ill. BAL minták esetén számolhatunk gomba konídiumok jelenlétével (White és mtsai, 2010/a). Biológiai mintákból történő kinyerésük egyik legkritikusabb fázisa a gomba konídiumok, ill. micéliumok mechanikai feltárása (bead-beating), amely optimális esetben kellően hatékony, azonban mégsem túl drasztikus, hogy a nukleinsavakat roncsolja. **Annak ellenére, hogy a teljes vér, ill. BAL minták tartalmazzák az egységnyi térfogatra eső legtöbb gomba nukleinsav molekulát,** ez utóbbiak extrakciója egy soklépéses folyamat, jelentős eszközigénnyel, speciális berendezésekkel, nehezen standardizálható.

A gomba nukleinsav molekulák **BAL mintákból** történő kinyerése a mai napig a szakma figyelmének a fókuszában áll. Ezek a mintavételezések invazív beavatkozást igényelnek, ezért csak indokolt esetben jut a szakember hozzájuk, s betegség nyomon követésre sem használhatóak (Guo és mtsai, 2010; Ostrosky-Zeichner, 2012). Azonban az osztályon fekvő betegek **teljes vér, plazma,** ill. **szérum** mintái a biomarker analízisen alapuló infektológiai tesztek kiváló vizsgálati objektumai lehetnek (Bustin és mtsai, 2009).

A 2010-ben nyilvánosságra hozott EAPCRI irányelvek többek között arról számoltak be, hogy **az *Aspergillus* PCR-ek diagnosztikai hatékonyságát alapvetően a gomba nukleinsavak biológiai mintákból történő kinyerésének eredményessége befolyásolja** (White és mtsai, 2010/a/b), ill., hogy a teljes vérmintákkal való munkafolyamatok során **a gombasejtek mechanikai feltárása, a vörösvértestek, ill. a fehérvérsejtek eliminálása jelentős hatással lehet a gomba nukleinsavak izolálási hatékonyságának romlására is** (Perry és mtsai, 2014), nem beszélve arról, hogy technológiailag és anyagilag is megterhelő (White és mtsai, 2006/a; White és mtsai, 2011. Perry és munkatársai egy 2014-ben megjelent tanulmányukban arról számoltak be, hogy **teljes vérminták esetén a molekuláris módszerek standardizációját nagymértékben támogatják a robotikus nukleinsav izoláló rendszerek,** úgy mint MagMAX (Life Technologies), EZ1 Advanced XL (Qiagen), easyMAG (bioMérieux). Mérési eredményeik alapján csak az easyMAG, EZ1, ill. a MagNA Pure platform volt képes a teljes vérminták 10 CFU kimutatására 100% hatékonysággal (Perry és mtsai, 2014). Denning és munkatársai már sok évvel ezelőtt úgy vélték, hogy **amennyiben a fagocitált konídium, ill. hifa töredékek felelnének a pozitív PCR eredményekért, akkor a párhuzamosan vizsgált vérkultúrák is pozitívnak bizonyulnának,** nem beszélve arról, hogy a neutropéniás betegek fehérvérsejtjeinek száma eleve kórosan csökkent mértéket mutat (Denning és mtsai, 1998; Costa és mtsai, 2002).

Az elmúlt néhány év során **a szérum, ill. plazma minták mind hangsúlyosabb szerephez jutottak** (Bernal-Martínez és mtsai, 2011; Loeffler és mtsai, 2015; White és mtsai, 2015/b), hiszen esetükben a **nukleinsav extrakció gyorsabb, költséghatékonyabb, nem beszélve arról, hogy a közbeiktatott munkafolyamatok számának mérséklésével arányosan csökken a környezeti kontamináció esélye is** (White és mtsai, 2015/a). Néhány éve még úgy vélték, hogy a szérum minták izolátumain végzett PCR-ek szenzitivitása elmarad a teljes vérmintákon tapasztaltakétól (Bernal-Martínez és mtsai, 2011), **azonban az elmúlt hat évben (2010-2015) mégsem született olyan tanulmány, amely teljes vérmintákon képes lett volna igazolni a diagnosztikai pontosság szignifikáns javulását** (Arvanitis és mtsai, 2014). Egészen friss tanulmányok azt boncolgatják, hogy a szérum, de még inkább a plazma minták nemcsak beteg-, ill. betegség nyomon követésre, de a konvencionális diagnosztikai módszerekhez (CT, tenyésztés) képest a helyes diagnózis akár 10,8-16,8 nappal hamarabb történő meghozatalára is alkalmasak (White és mtsai, 2015/b; Loeffler és mtsai, 2015).

✚ 3.1, **Munkám során dolgoztunk szérum, teljes vér, ill. BAL mintákkal manuális, ill. automata rendszerben. A biológiai minták jellegétől függően számos protokollt optimalizáltunk.** Prospektív eset-kontroll tanulmányunk során a **szérum** minták extrakciójához a Roche Applied Science, High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume kitet használtuk (mechanikai lízis nélküli **módszer-4**), amely a biológiai minták térfogatának széles tartományából (500 µl-2,5 ml) rendkívül hatékonyan képes a gomba eredetű nukleinsavakat kivonni.

Az ubikviter *Aspergillusok* a környezetben bárhol előfordulhatnak, ezért mind a minták feldolgozása, mind pedig a real-time analízisek során gondot jelenthet **a környezeti kontamináció.** Ennek **kiszűrésére az egyes munkafázisokat térben és időben is elválasztottuk egymástól.** Gomba eredetű nukleinsav molekulák gyakorlatilag mindenütt jelen lehetnek, ezért a csíramentesítés önmagában nem elegendő. Törekedtünk a steril eszközök, filteres pipettahegyek, külön csomagolt reakció csövek használatára, illetve az egyes munkafolyamatok megkezdése előtt a munkafelületek, reagensek, műanyag áruk UV kezelésére, majd a munkafolyamatok minden egyes fázisába a megfelelő kontrollok beiktatására (ECN, LCN, PCR-IC, PCR-NTC).

- ✚ 3.2, **Teljes vér**, ill. **BAL** minták nukleinsav extrakciójához a kerámia gyöngyös, mechanikai lízissel (Roche, MagNA Lyser) kombinált automata nukleinsav izoláló (Roche, MagNA Pure LC 2.0) platform bizonyult a leghatékonyabbnak (**módszer-1**). Az izoláló robottal számos protokollt teszteltünk, míg végül kiválasztottuk azt, amely számunkra a legoptimálisabbnak bizonyult. A kiindulási minták térfogata ez utóbbi esetében 200 µl és az elútumé pedig 50 µl.
- ✚ 3.3, **Meglepetésünkre, mérési eredményeink alapján az ugyancsak automata rendszerű, 1 ml-es protokoll, amely az ötszörös térfogat többletnek köszönhetően ötször nagyobb eséllyel lenne képes detektálni a biológiai mintákban, nyomnyi mennyiségben jelen levő gomba nukleinsavakat, meg sem közelítette szenzitivitásban a 200 µl-es protokollt, amely esetében az elútum térfogata duplája.** A PCR reakciók szenzitivitása csak egy bizonyos mértékig változik arányosan a mintákban található nukleinsav detektálási esélyével, ugyanis a környezeti és egyéb inhibítorok nem megfelelő eliminálása egyaránt jelentősen ronthatják a PCR reakciók szenzitivitását, megnövelvén a fals-pozitívok arányát ([Johnson és mtsai, 2012](#)). Negatív asszociáció figyelhető meg továbbá az elútum térfogatának növelése ( $\geq 100 \mu\text{l}$ ) és a real-time detektálás hatékonysága között is ([White és mtsai, 2011](#)).

Valószínű, hogy **az invazív aszpergillózis rutin infekció kontrollja automatizált rendszerben lesz majd megvalósítható**, amely a szigorú óvintézkedések betartása mellett (esetleg egy teljesen zárt, automatizált rendszerben, ahol a post-elúciós alkalmazások is robotizálva vannak, mint **pl. a Roche, Cobas® Amplicor moduláris rendszer**) minimálisra csökkentheti a környezeti kontamináció veszélyét, továbbá egyben megoldást jelenthet a standardizációra is.

- ✚ 4.1, **Az ISHAM-EAPCRI laboratóriumi munkacsoportjának tagjaként részt vehettünk a 2014-es körkontrollos BAL panelek vizsgálatában, amelyek egy része *Aspergillus fumigatus* eredetű nukleinsav molekulákat, míg más részük *Aspergillus fumigatus* konídiumokat tartalmazott különböző koncentrációban.** A BAL panelek térfogata 500 µl volt, ezért mi automata rendszerben a panel-minták térfogatának kevesebb, mint a felét (40%) voltunk képesek monitorozni specifikus *facC* ortológ markerek jelenlétére.

A **módszer-1**, ill. a **módszer-4** adatsorainak analízisét követően elmondható, hogy míg az előbbi a módszerek 52,78%-ánál (19/36), addig az utóbbi azok 48,48%-ánál (16/36) teljesített jobban, így az általunk optimalizált módszerek a körkontrollos vizsgálatok eredményei alapján a nemzetközi viszonylatban az erős középmezőnyben foglalnak helyet.

A módszer-1 LoD-ja *Aspergillus fumigatus* konídium és gDNS tartalmú BAL paneleken 5 GE. A módszer-1 az *Aspergillus fumigatus* nukleinsav tartalmú BAL minták analízisekor 14 pontot kapott a maximálisan adható 16-ból, amellyel magasan az átlag felett (11,2 pont) teljesített, és amelynél a fennmaradó 35 módszer 11,43%-a (4 a 35-ből) bizonyult csak jobbnak. **Kiemelendő továbbá, hogy a körkontrollos BAL panelek analízise alapján, a módszer-1 specificitása, ill. a módszer-4 szenzitivitása egyaránt 100%.**

A módszer-1, ill. a módszer-3 esetében a mechanikai lízist kivéve, mind a nukleinsav extrakció (Roche, MagNA Pure LC 2.0 nukleinsav izoláló robot), mind pedig a real-time analízis (Roche, LightCycler 2.0 kapilláris rendszer) teljesen azonos körülmények között zajlott, mégis **a módszer-3 esetében egy általános, 40%-os teljesítménybeli romlás volt megfigyelhető a módszer-1-hez mérten.** Érdekes, hogy a módszer-3 egyáltalán nem volt képes a genomi DNS jelenlétét kimutatni a BAL mintákban, amely feltételezésünk szerint a Roche SeptiFast mechanikai lízis számlájára írandó.

- ✚ 4.2, Megállapítható tehát az is, hogy **az általunk optimalizált, kerámiagyöngyös-mechanikai lízis rendkívül hatékonyan tárja fel a biológiai (BAL) mintákban jelen levő *Aspergillus fumigatus* konídiumokat úgy, hogy közben nem roncsolja szét teljesen a gomba eredetű nukleinsavakat sem.**

**A korai és pontos diagnózis rendkívüli jelentőségű, hiszen amíg az aszpergillózisos betegek túlélési esélyei jelentős mértékben csökkennek, addig kezelésük költségei drasztikus mértékben növekednek az idő és a betegség előrehaladtával.** Habár az elmúlt évek során számos, jelentős előrelépésről számoltak be mind a transzplantációs gyakorlat, mind pedig az antifungális terápia területéről, mai napig komoly kihívást jelent az invazív tüdőaszpergillózisban szenvedő betegek gyors és megfelelő ellátása (Sinkó és mtsai, 2011).

Az intenzív osztályokon fekvő, hematológiai megbetegedésekben szenvedő és invazív aszpergillózissal is kezelt betegek mortalitása megközelítheti akár a 90%-ot is (Meersseman és mtsai, 2004), azonban az időben megkezdett, célzott diagnózissal a csüggesztő statisztikai mutatókban jelentős javulás lenne elérhető (Slobbe és mtsai, 2008).

A súlyosan immungyenge, szerv (5%), ill. csontvelő transzplantált (10%), továbbá a különböző, főleg hematológiai megbetegedésekben (elsősorban akut leukémia) szenvedő betegek, hosszan tartó, elhúzódó neutropéniával, jelentős veszélynek vannak kitéve az invazív tüdőaszpergillózis szempontjából (Wheat és Walsh, 2008; Pagano, 2011), ezért esetükben a **kórházi infekciókontroll részeként bevált stratégia az empirikus antifungális profilaxis alkalmazása** az esetlegesen fellépő gombainfekciók visszaszorítására (Mikolajewska és mtsai, 2012). Az kórházi gyakorlatban az antifungális terápiának jelenleg még mindig az empirikus megközelítése a gyakoribb. Tehát **annak érdekében, hogy mielőtt még a betegség kontrollálhatatlanná válna, a betegek állapotában visszafordíthatatlan károkat okozván, a klinikusok** a korábban bevált gyakorlatnak és az intézmények anyagi helyzetének megfelelően **antifungális profilaxist kezdenek** a nem szűnő lázas állapot és aszpergillózisra utaló CT eredmények alapján (Barnes és mtsai, 2009).

Ugyancsak jellemző módon azonban, az előzetesen meghozott diagnózisok többnyire sem a különböző helyről vett biológiai minták tenyésztésével, sem a hisztopatológiai eljárásokkal nem igazolhatóak (Cornillet és mtsai, 2006; Ostrosky-Zeichner, 2012). Ennek oka abban is keresendő, hogy a konvencionális módszerek a betegséget már csak előrehaladott stádiumában képesek kimutatni.

A megfelelően definiált rizikócsoporthoz olyan rutin, biomarker-monitorozáson alapuló tesztek lennének alkalmasak, amelyek nemcsak, hogy kellően érzékenyek, de a magas negatív prediktív értékek mellett jó diagnosztikai erővel is rendelkeznek ahhoz, hogy a klinikusokat szükség esetén a profilaktikus céllal megkezdett empirikus antifungális terápia megszakítására sarkallják, mérsékelvén a magas kórházi költségeket és az erősen cito-, ill. hepatotoxikus terápiás szerek káros mellékhatásait (Einsele és Loeffler, 2008; Ostrosky-Zeichner, 2012).

✚ 5.1, **Miután megalakult a Debreceni Egyetemen a molekuláris biológusokat, genetikusokat, mikrobiológusokat, hematológus és patológus szakembereket magában foglaló, invazív aszpergillózis munkacsoportunk, egy éven át tartó, prospektív, eset-kontroll vizsgálatba kezdtünk.** Célunk az volt, hogy a kombinált biomarker monitorozáson alapuló, beteg nyomonkövetési stratégiánk diagnosztikai erejét vizsgáltuk. Mivel invazív tüdőaszpergillózis leginkább a hosszan elhúzódó, neutropeniás betegeket súlytja, és csekély azon közlemények száma, amelyek ennek ellenkezőjéről számolnának be, ezért tanulmányunkba főként súlyos, hematológias megbetegedésekben (70,4%) szenvedő, lázas neutropeniás betegek kerültek bevonásra (Cornillet és mtsai, 2006).

A betegeket, a különböző vizsgálati eredmények alapján, a klinikus kollégák utólag, retrospektív módon sorolták az EORTC/MSG gomba mikózisokra vonatkozó irányelveinek megfelelően a háromfokozatú kockázati rendszer kategóriáinak (bizonyított, valószínű, nem bizonyított) egyikébe (Tsitsikas és mtsai, 2012). Így a betegek 25,93%-a képezte az eset csoportot (bizonyított és valószínű), míg 74,07%-uk a kontroll (nem bizonyított). A betegek szérum mintáinak párhuzamos aliquot-ait vizsgáltuk az egyes biomarkerek jelenlétére mind a GM-szerológiai, mind pedig PCR méréseink során.

✚ 5.2, **Diagnosztikai és terápiás stratégiánk részeként a láz megjelenésének első napján intenzív biológiai marker-monitorozásba kezdtünk, és három egymást követő napon (átlag:  $3.11 \pm 2.36$ ) vizsgáltuk a betegek szérum mintáit *Aspergillus* genus specifikus GM antigének (Platelia *Aspergillus* GM-EIA), ill. *Aspergillus fumigatus* specifikus nukleinsav target molekulák (*facC*-PCR) jelenlétére.**

A biomarker analízisekkel párhuzamosan, minden epizódról készült mellkas CT, amely az esetek mindössze 57%-ában (4 eset a 7-ből, melyek közül 3 bizonyított és 1 valószínű kategória) volt képes az invazív gomba fertőzést megerősíteni. BAL-t az esetek 77,78%-ában végeztek (6 eset és 15 kontroll), amely viszont az esetek 86%-ában (5 epizód a 6-ból) nem detektálta az invazív aszpergillózt.

Az epizódok 44.44%-a jól reagált a láz fellépésekor megkezdett széles spektrumú antibiotikum terápiára, míg azon epizódok amelyek esetében nem mérséklődött a láz, antifungális terápiát kezdeményeztek. Utólag igazolást nyert azonban, hogy **a preventív jelleggel kezdeményezett empirikus antifungális terápia az esetek 60%-ában** (9 kontroll a 15 lázas beteg közül) **feleslegesen terhelte a betegek szervezetét.**

- ✚ 5.3, Megállapítottuk, hogy **mind a CT, mind pedig a BAL magas negatív prediktív értékmutatókkal rendelkeznek** ( $PV^- = 0.85$ , ill.  $PV^- = 0.93$ ) külön-külön, és együtt is ( $PV^- = 0.92$ ) **tehát sokkal inkább alkalmasak az invazív tüdőaszpergillózis kizárására, mint megerősítésére.** Még magasabb negatív prediktív értékeket mértünk az *Aspergillus* GM-EIA és a CT módszerek kombinációjával ( $PV^- = 0.94!$ ).
- ✚ 5.4, A betegek 48,15%-a elhalálozott a nyomonkövetési időszak során. Posztmortem hisztológiai vizsgálatot 53,84%-uk esetében végeztek. Három epizód esetében mutatkozott jelentős ellentmondás a PMH adatok, ill. a klinikai vizsgálatok eredményei között, amelyek közül kiemelendő egy lázталanná váló beteg, amelynek a közel két hónapos nyomonkövetési időszaka során a negatív GM-szerológiai eredményekkel szemben a *facC*-PCR konstans pozitív eredményeket mutatott, és amelynek halálát követően a PMH vizsgálat végül egyértelműen igazolta a tüdejében tenyésző *Aspergillus* gombafonalakat.
- ✚ 5.5, A kombinált biomarker analízisek lezárultával meghatároztuk a módszerek diagnosztikai esélyhányadosait, melyek közül a **Platelia *Aspergillus* GM-EIA esetében, DOR = 15,33, míg a *facC*-PCR esetében, DOR = 28,67 voltak.** Alacsony mintaszámú, prospektív eset-kontroll tanulmányunk egy éves beteg-nyomonkövetéseinek lezárultával kapott eredményeinket vizsgálva elmondható, hogy **az általunk tapasztalt *Aspergillus* GM-EIA esszé szenzitivitása és a kalkulált diagnosztikai esélyhányados értékek meglehetősen elmaradnak azoktól, amelyeket a szakirodalmi adatok túlnyomó többsége közöl.**

Az 1997–2009 közti több, mint tíz évet átívelő időszakban 30 publikált, az *Aspergillus* GM-EIA módszer diagnosztikai erejét vizsgáló tanulmány látott napvilágot, melyek közül a vizsgált betegpopuláció 27 esetben ugyancsak különböző, hematológiai megbetegedésekben szenvedő, neutropeniás betegeket tartalmazott. Ezen adatok alapján az *Aspergillus* GM-EIA szenzitivitása (18-100%), és specificitása (67-100%) ugyancsak tág tartományok között mozog (Becker és mtsai, 2003; Maertens és mtsai, 2004; Suankratay és mtsai, 2006; Lai és mtsai, 2007).

Az a tény, mely szerint a PCR módszer jobb diagnosztikai erővel rendelkezik(het) az *Aspergillus* GM-szerológiánál a technológia jelen állása alapján nem meglepő. 15 évvel ezelőtt még úgy vélték, hogy a GM vérben található szintje az invazív *Aspergillusok* gyors növekedésének, valamint sejtfaluk dinamikus átrendeződésének köszönhetően lényegesen magasabb a gomba nukleinsavakénál, amelyeknek mennyiségét akkor (30 fg/1 ml szérum) körülbelül 1-2 *Aspergillus fumigatus* genomnyira becsülték (Verweij és mtsai, 2000; Costa és mtsai, 2002), így az a tény, hogy az GM antigén detektáláson alapuló immunoesszék érzékenyebbek a nukleinsav diagnózison alapuló módszereknél, általunk is megcáfolásra került.

Mivel még az invazív aszpergillózis szempontjából magas rizikójú betegcsoportok esetében is az a jellemző, hogy a betegség prevalenciája többnyire alig haladja meg a 15%-ot (White és mtsai, 2015/b), ezért **kiemelkedő jelentőséggel bírna egy olyan vészforgatókönyv a megfelelő kórházi infekciókontroll elősegítésére** (Sinkó és mtsai, 2011), amely gyors, olcsó, invazív beavatkozást nem igénylő, egymást kölcsönösen támogató molekuláris esszék kombinált (GM-szerológia és PCR) használatán alapul, magas negatív prediktív értékekkel a betegség kizárására (*Aspergillus* GM-szerológia és *facC*-PCR esetén ez PV=1!), ugyanakkor magas szenzitivitással a kórokozó(k) azonosítására, elősegítvén a pre-emptive antifungális terápiás döntések meghozatalát. Az általunk tapasztalt betegség prevalencia még az előbb taglaltakénál is magasabb, 25,9% volt, amely egyáltalán nem meglepő a tervezett eset-kontroll tanulmányok alkalmával.

**Végezetül pedig véleményünk szerint diagnosztikai tesztünket jó eséllyel lehetne kitesítve kereskedelmi forgalomba bocsátani.** A legideálisabb alternatíva az lenne, ha azt zárt, automata rendszerre szabnánk (pl. Roche Cobas moduláris rendszer). Mindenekelőtt talán az lenne a legcélravezetőbb, ha olyan, magyarországi, privát, laboratóriumi diagnosztikával foglalkozó cégeket keresnénk fel (pl. PentacoreLab), amelyek rendelkeznek a szükséges technológiával (RT-PCR), és így tesztünket mind szélesebb körök számára tennék hozzáférhetővé.

## 12. ÖSSZEFOGLALÁS

PhD munkám alapvető célja olyan PCR módszerek fejlesztése volt, amelyek képesek az invazív aszpergillózis azonosítására. Ennek megfelelően nyolc Taqman® real-time esszét (4 Taqman®-MGB és 4 Taqman®-LNA) fejlesztettünk az *Aspergillus fumigatus* és az *Aspergillus terreus* fajok detektálására, ill. egy HRM esszét az *Aspergillus fumigatus* és *Aspergillus lentulus* fajok azonosítására amplikonjaik olvadáspontjai alapján. Különböző általunk, ill. az ISHAM-EAPCRI központi laboratóriumi munkacsoportja által készített genomi DNS paneleken meghatároztuk esszéink reakció hatékonyságát, szenzitivitását, specificitását, és *Aspergillus fumigatus*, ill. *Aspergillus terreus* konídium tartalmú teljes vér paneleken a diagnosztikai hatékonyságukat. Taqman®-LNA3 és Taqman®-LNA4 esszéink rendelkeztek a legalacsonyabb LoD értékekkel, ennek megfelelően dinamikus tartományukat nagyszámú szérum mintán tovább teszteltük. Az ISHAM-EAPCRI laboratóriumi munkacsoport tagjaként saját fejlesztésű diagnosztikai tesztheinkkel és általunk optimalizált eljárásokkal részt veszünk nemzetközi, körkontroll vizsgálatokban, ahol a további résztvevőkkel együttműködve validálunk és standardizálunk PCR alapú, aszpergillózis detektáló módszereket, ill. vizsgáljuk, melyek azok a tényezők, amelyek befolyással bírnak diagnosztikai hatékonyságukra. Mérési eredményeink alapján megállapítható, hogy biológiai minták széles skáláján (teljes vér, szérum, BAL) és térfogat tartományában (2,5 ml-200 µl) vagyunk képesek gomba nukleinsavak biológiai mintákból való hatékony kinyerésére (közel 100%) mind manuális, mind pedig automata rendszerben. Továbbá sikeresen optimalizáltunk egy olyan mechanikai lízis protokollt, amely méréseink alapján nukleinsav veszteség nélkül képes az *Aspergillus* konídiumok biológiai mintákból történő hatékony feltárására. További célunk volt a *facC*-PCR és az *Aspergillus* GM-EIA módszerek diagnosztikai erejének a mérése invazív tüdő aszpergillózis detektálására különböző hematológias megbetegedésben szenvedő, lázas neutropeniás betegek nagyszámú szérum mintáin. A posztmortem hisztológiai eredmények ismeretében elvégeztük a szükséges korrekciót a betegek kategorizálását illetően és ennek megfelelően megmértük a *facC*-PCR és az *Aspergillus* GM-EIA módszerek diagnosztikai pontosságát (AUC *facC*-PCR esetében 0,80, míg a GM-EIA esetében 0,73) és megállapítottuk, hogy a *facC*-PCR-hez tartozó esélyhányados (DOR *facC*-PCR 28,67) magasabbnak bizonyult a GM-EIA-hoz tartozónál (DOR GM-EIA 15,33). Prospektív esetkontroll tanulmányunk során meghatároztuk a konvencionális klinikai módszerek (CT, ill. BAL) diagnosztikai értékét és összehasonlítottuk a kombinált biológiai marker-monitorozásával (*facC*-PCR és GM-EIA kombinált analízis). Az egyezés 70,13% volt, amely alapján a kappa statisztika 0,258-nak adódott. Eredményeink alapján igazolást nyert, hogy a konvencionális diagnosztikai módszerek és a PCR-el kombinált biológiai marker monitorozások eredményeinek együttes figyelembe vétele képes lehet korai és hatékony diagnózis felállítására.

## 11. SUMMARY

The primary aim of this study was to develop PCR methods targeting *facC* orthologous genes for the sensitive detection of invasive aspergillosis in different biological samples. Accordingly we developed eight Taqman® real-time assays (4 Taqman®-MGB and 4 Taqman®-LNA) to specifically detect *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus* species and one HRM assay to differentiate among *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus lentulus* based on the melting points of their amplicons. We evaluated the PCR amplification efficiency, sensitivity and the specificity of our assays on different genomic DNA panels made in-house and received from the ISHAM-EAPCRI core laboratory working party. We measured the diagnostic utility of our Taqman® real-time assays on biological samples; whole blood and serum spiked with different amount of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus* conidia. Taqman®-LNA3 and Taqman®-LNA4 showed the lowest LoD values on whole blood samples therefore we measured their dynamic range on numerous serum samples. As a member of the ISHAM-EAPCRI laboratory working party we also participated with our in-house PCR platforms in international cross-control studies to identify the most important variables influencing the diagnostic performance of *Aspergillus*-PCR and collaborate with other members of the laboratory working party to validate a standard for *Aspergillus*-PCR methodology. Based on the results we can conclude that we were able to develop a very efficient mechanical lysis protocol to disrupt *Aspergillus* conidia without losing the freely floating nucleic acids from the biological samples and we can extract fungal nucleic acids from biological samples in both automated and manual platform with nearly 100% efficiency. Our secondary aim was to validate the diagnostic power of our *facC*-PCR method and the gold-standard *Aspergillus*-GM serology diagnosing invasive pulmonary aspergillosis on large volume serum samples in patients with hematological malignancies and febrile neutropenia. Stratification correction followed by postmortem histology was done and according to this the diagnostic accuracy indexes (AUC for *facC*-PCR was 0.80 and for GM-EIA was 0.73) and the diagnostic odds ratio of *facC*-PCR proved to be higher (DOR was 28.67) compared to GM-EIA (DOR was 15.33). We also assessed the diagnostic value of standard clinical methods (CT and BAL) and compared to that of combined biomarker testing (*Aspergillus* GM-serology and *facC*-PCR) in our prospective case-control study. The observed agreement was 70.13% generating a kappa statistics of 0.258. With our results we demonstrated evidence that the consideration of standard clinical methods with combined biomarker testing can improve early and more accurate diagnostic decisions.

### 13. IRODALOMJEGYZÉK

- 1 **Alcazar-Fuoli L**, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. *Aspergillus* section Fumigati: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother.* **2008**;52(4):1244-51.
- 2 **Allen MJ**, Voelker DR, Mason RJ. Interactions of surfactant proteins A and D with *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* **2001**;69(4):2037-44.
- 3 **Antimori S**, Nebuloni M, Magni C, Fasan M, Adorni F, Viola A, Corbellino M, Galli M, Vago G, Parravicini C, Ridolfo AL. Trends in the postmortem diagnosis of opportunistic invasive fungal infections in patients with AIDS: a retrospective study of 1,630 autopsies performed between 1984 and 2002. *Am J Clin Pathol.* **2009**;132(2):221-7.
- 4 **Arvanitis M**, Ziakas PD, Zacharioudakis IM, Zervou FN, Caliendo AM, Mylonakis E. PCR in diagnosis of invasive aspergillosis: a meta-analysis of diagnostic performance. *J Clin Microbiol.* **2014**;52(10):3731-42.
- 5 **Aquino VR**, Goldani LZ, Pasqualotto AC. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycopathologia* **2007**; 163: 191-202.
- 6 **Babior BM**, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest.* **1973**;52(3):741-4.
- 7 **Baddley JW**, Pappas PG, Smith AC, Moser SA. Epidemiology of *Aspergillus terreus* at a university hospital. *J Clin Microbiol.* **2003**;41(12):5525-9.
- 8 **Balajee SA**, Weaver M, Imhof A, Gribskov J, Marr KA. *Aspergillus fumigatus* variant with decreased susceptibility to multiple antifungals. *Antimicrob Agents Chemother.* **2004**;48(4):1197-203.
- 9 **Barnes RA**, White PL, Bygrave C, Evans N, Healy B, Kell J. Clinical impact of enhanced diagnosis of invasive fungal disease in high-risk haematology and stem cell transplant patients. *J Clin Pathol.* **2009**;62(1):64-9.
- 10 **Barratt RW**, Johnson GB, Ogata WN. Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **1965**; 52(1):233-246.
- 11 **Barton RC**. Laboratory Diagnosis of Invasive Aspergillosis: From Diagnosis to Prediction of Outcome. *Scientifica.* **2013**; 459405.
- 12 **Beauvais A**, Latgé JP. Membrane and cell wall targets in *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist Updat.* **2001**;4(1):38-49.
- 13 **Becker MJ**, Lugtenburg EJ, Cornelissen JJ, Van Der Schee C, Hoogsteden HC, De Marie S. Galactomannan detection in computerized tomography-based broncho-alveolar lavage fluid and serum in haematological patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *Br J Haematol.* **2003**;121(3):448-57.
- 14 **Bellocchio S**, Montagnoli C, Bozza S, Gaziano R, Rossi G, Mambula SS, Vecchi A, Mantovani A, Levitz SM, Romani L. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J Immunol.* **2004/a**;172(5):3059-69.
- 15 **Bellocchio S**, Moretti S, Perruccio K, Fallarino F, Bozza S, Montagnoli C, Mosci P, Lipford GB, Pitzurra L, Romani L. TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J Immunol.* **2004/b**;173(12):7406-15.

- 16 **Bennett JW.** [Taxonomy of fungi and biology of the \*Aspergilli\*](#). *Biology of Industrial Microorganisms*. Demain AL and Solomon NA. Menlo Park, Calif. Benjamin/Cummings Pub. Co., Advanced Book Program. **1985**; 359-406.
- 17 **Bennett JW.** [Adrenalin and cherry trees](#). *Modern Drug Discovery* **2001**; 4(12): 47-51.
- 18 **Bernal-Martínez L, Gago S, Buitrago MJ, Gomez-Lopez A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M.** [Analysis of Performance of a PCR-Based Assay To Detect DNA of \*Aspergillus fumigatus\* in Whole Blood and Serum: a Comparative Study with Clinical Samples](#). *J Clin Microbiol.* **2011**; 49(10): 3596–3599.
- 19 **Bergeron A, Porcher R, Sulahian A, de Bazelaire C, Chagnon K, Raffoux E, Vekhoff A, Cornet M, Isnard F, Brethon B, Lacroix C, Poirot JL, Bouges C, Derouin F, Tazi A, Ribaud P.** [The strategy for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis should depend on both the underlying condition and the leukocyte count of patients with hematologic malignancies](#). *Blood.* **2012**;119(8):1831-7; quiz 1956.
- 20 **Birkó Z, Sümegi A, Vinnai A, van Wezel G, Szeszák F, Vitális S, Szabó PT, Kele Z, Janáky T, Biró S.** [Characterization of the gene for \*Factor C\*, an extracellular signal protein involved in morphological differentiation of \*Streptomyces griseus\*](#). *Microbiology.* **1999**; 145(9): 2245-2253.
- 21 **Biró S, Békési I, Vitális S, Szabó G.** [A substance effecting differentiation in \*Streptomyces griseus\*](#). *European Journal of Biochemistry / FEBS.* **1980**; 103 (2): 359-363.
- 22 **Blum G, Perkhofer S, Haas H, Schrettl M, Würzner R, Dierich MP, Lass-Flörl C.** [Potential basis for amphotericin B resistance in \*Aspergillus terreus\*](#). *Antimicrob Agents Chemother.* **2008**;52(4):1553-5.
- 23 **Bodey G, Bueltmann B, Duguid W, Gibbs G, Hanak H, Hotchi M, Mall G, Martino P, Meunier F, Milliken S, Naoe S, Okudaira M, Scevola D, Wout JV.** [Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey](#). *Eur J Clin Infect Dis.* **1992**; 17:705-707.
- 24 **Bolehovska R, Pliskova L, Buchta V, Cerman J, Hamal P.** [Detection of \*Aspergillus\* spp. in biological samples by real-time PCR](#). *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* **2006**;150(2):245-8.
- 25 **Bretagne S, Costa JM, Marmorat-Khuong A, Poron F, Cordonnier C, Vidaud M, Fleury-Feith J.** [Detection of \*Aspergillus\* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR](#). *J Clin Microbiol* **1995**; 33: 1164-1168.
- 26 **Brown GD.** [Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes](#). *Annu Rev Immunol.* **2011**;29:1-21.
- 27 **Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC.** [Hidden killers: human fungal infections](#). *Sci Transl Med.* **2012**;4(165):165rv13.
- 28 **Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT.** [The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments](#). *Clin Chem.* **2009**;55(4):611-22.
- 29 **Cesaro S, Stenghele C, Calore E, Franchin E, Cerbaro I, Cusinato R, Tridello G, Manganelli R, Carli M, Palù G.** [Assessment of the lightcycler PCR assay for diagnosis of invasive aspergillosis in paediatric patients with onco-haematological diseases](#). *Mycoses.* **2008**;51(6):497-504.
- 30 **Chai L, Netea MG, Teerenstra S, Earnest A, Vonk AG, Schlamm HT, Herbrecht R, Troke PF, Kullberg BJ.** [Early proinflammatory cytokines and C-reactive protein trends as predictors of outcome in invasive Aspergillosis](#). *J Infect Dis.* **2010**;202(9):1454-62.

- 31 **Chambers ST**, Bhandari S, Scott-Thomas A, Syhre M. [Novel diagnostics: progress toward a breath test for invasive \*Aspergillus fumigatus\*](#). *Med Mycol.* **2011**;49 Suppl 1:S54-61.
- 32 **Champness W**. [Actinomycete development, antibiotic production, and phylogeny: questions and challenges](#). *Prokaryotic Development.* **2000**; pp. 11-31. Edited by Brun Y. V. and Shimkets L. J. Washington DC: American Society for Microbiology.
- 33 **Chater KF**, Biró S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H. [The complex extracellular biology of \*Streptomyces\*](#). *FEMS Microbiol Rev.* **2010**;34(2):171-98.
- 34 **Chazalet V**, Debeaupuis JP, Sarfati J, Lortholary J, Ribaud P, Shah P, Cornet M, Thien HV, Gluckman E, Brücker G, Latge JP. [Molecular Typing of Environmental and Patient Isolates of \*Aspergillus fumigatus\* from Various Hospital Settings](#). *J Clin Microbiol.* **1998**; 36(6): 1494–1500.
- 35 **Che CY**, Jia WY, Xu Q, Li N, Hu LT, Jiang N, Lin J, Wang Q, Zhao GQ. [The roles of surfactant protein D during \*Aspergillus fumigatus\* infection in human corneal epithelial cells](#). *Int J Ophthalmol.* **2012**;5(1):13-7.
- 36 **Chen SC**, Kontoyiannis DP. [New molecular and surrogate biomarker-based tests in the diagnosis of bacterial and fungal infection in febrile neutropenic patients](#). *Curr Opin Infect Dis.* **2010**;23(6):567-77.
- 37 **Compton J**. [Nucleic acid sequence-based amplification](#). *Nature.* **1991**;350(6313):91-2.
- 38 **Cornillet A**, Camus C, Nimubona S, Gandemer V, Tattevin P, Belleguic C, Chevrier S, Meunier C, Lebert C, Aupée M, Caulet-Maugendre S, Faucheux M, Lelong B, Leray E, Guiguen C, Gangneux JP. [Comparison of epidemiological, clinical, and biological features of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients: a 6-year survey](#). *Clin Infect Dis.* **2006**;43(5):577-84.
- 39 **Costa C**, Costa JM, Desterke C, Botterel F, Cordonnier C, Bretagne S. [Real-time PCR coupled with automated DNA extraction and detection of galactomannan antigen in serum by enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of invasive aspergillosis](#). *J Clin Microbiol.* **2002**;40(6):2224-7.
- 40 **De Pauw B**, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas PG, Maertens J, Lortholary O, Kauffman CA, Denning DW, Patterson TF, Maschmeyer G, Bille J, Dismukes WE, Herbrecht R, Hope WW, Kibbler CC, Kullberg BJ, Marr KA, Muñoz P, Odds FC, Perfect JR, Restrepo A, Ruhnke M, Segal BH, Sobel JD, Sorrell TC, Viscoli C, Wingard JR, Zaoutis T, Bennett JE; European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. [Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group \(EORTC/MSG\) Consensus Group](#). *Clin Infect Dis.* **2008**;46(12):1813-21.
- 41 **Demitrovicova A**, Liskova A, Valach M, Izakovic M, Noge A, Baranova J, Kalatova D, Syrovatkova L, Velicova J, Bugykova B, Gulasova I, Seinova D, Mikolasova G, Mutalova M, Pilkova M, Szabo I, Findova L, Madarasz I, Stanzyk M, Mikulickova D, Blazekova M, Jankechova M, Slezakova Z, Kuriplachova G, Visnovsky J, Obrocnikova A, Blumm M, Blumm B, Wolfram S, Zeleny P, Otrubova J, Rudinsky B, Nagyova Z, Vravcova M, Kajaba J, Jexova S, Oravec S, Toth S, Klobucka S, Gerigh J, Schumann F, Ambra R, Bandura P, Bonnack C, Kubisova Z, Palo M, Kalavsky E, Drgona L, Mahesvaari R, Riedl J. [Fungal neuroinfections and fungaemia: unexpected increase of mortality from invasive fungal infections in 2005-2011 in comparison to 1989-1998: analysis of 210 cases](#). *Neuro Endocrinol Lett.* **2013**;34(Suppl 1):32-5.

- 42 **Denning** DW, Stevens DA. [Antifungal and surgical treatment of invasive aspergillosis: review of 2,121 published cases](#). Rev Infect Dis. **1990**;12(6):1147-201.
- 43 **Denning** DW. [Invasive aspergillosis](#). Clin Infect Dis. **1998**; 26:781-803.
- 44 **Denning** DW, Kibbler CC, Barnes RA; British Society for Medical Mycology. [British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections](#). Lancet Infect Dis. **2003**;3(4):230-40.
- 45 **Denning** DW. [Aspergillosis](#). Educational material supplied by The Aspergillus Website. **2006**; Shering-Plough Corporation.
- 46 **Diamond** RD, Krzesicki R, Epstein B, and Jao W. Damage to hyphal forms of fungi by human leukocytes in vitro. [A host defense mechanism in aspergillosis and mucormycosis](#). Am J Pathol. **1978**; 91(2): 313–328.
- 47 **Duval** MS, Donnelly PJ, Barnes R, Loeffler J. [PCR-based methods with aspergillosis as a model](#). Journ Invasive Fung Inf. **2008**. Vol2 No 2.
- 48 **Einsele** H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Müller CA, Bowden RA, van Burik J, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U. [Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes](#). J Clin Microbiol. **1997**;35(6):1353-60.
- 49 **Einsele** H, Loeffler. [Contribution of new diagnostic approaches to antifungal treatment plans in high-risk haematology patients](#). Clin Microbiol Infect. **2008**;14 Suppl 4:37-45.
- 50 **Erjavec** Z, Verweij PE. [Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host](#). Drug Resistance Updates. **2002**;5 (1): 3-10.
- 51 **Fitzpatrick** DA. [Horizontal gene transfer in fungi](#). FEMS Microbiol Lett. **2012**;329(1):1-8.
- 52 **Florent** M, Katsahian S, Vekhoff A, Levy V, Rio B, Marie JP, Bouvet A, Cornet M. [Prospective Evaluation of a Polymerase Chain Reaction-ELISA Targeted to \*Aspergillus fumigatus\* and \*Aspergillus flavus\* for the Early Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Patients with Hematological Malignancies](#). J Infect Dis **2006**; 193: 741-7.
- 53 **Förster** T. [Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz \[Intermolecular energy migration and fluorescence\]](#). Annalen der Physik **1948**; 437:55-75.
- 54 **Freifeld** AG, Bow EJ, Sepkowitz KA, Boeckh MJ, Ito JI, Mullen CA, Raad II, Rolston KV, Young JA, Wingard JR, Infectious Diseases Society of America. [Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the infectious diseases society of America](#). Clin Infect Dis. **2011**;52(4):e56-93.
- 55 **Garlanda** C, Hirsch E, Bozza S, Salustri A, De Acetis M, Nota R, Maccagno A, Riva F, Bottazzi B, Peri G, Doni A, Vago L, Botto M, De Santis R, Carminati P, Siracusa G, Altruda F, Vecchi A, Romani L, Mantovani A. [Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response](#). Nature. **2002** 14;420(6912):182-6.
- 56 **Garlanda** C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A. [Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility](#). Annu Rev Immunol. **2005**;23:337-66.
- 57 **Garlanda** C, Bottazzi B, Salvatori G, De Santis R, Cotena A, Deban L, Maina V, Moalli F, Doni A, Veliz-Rodriguez T, Mantovani A. [Pentraxins in innate immunity and inflammation](#). Novartis Found Symp. **2006**;279:80-6; discussion 86-91, 216-9.

- 58 **Gemma L.** Johnson, David F. Bibby, Stephenie Wong, Samir G. Agrawal, Stephen A. Bustin. [A MIQE-Compliant Real-Time PCR Assay for \*Aspergillus\* Detection](#). PLoS One. **2012**; 7(7): e40022.
- 59 **Grocott RG.** [A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic](#). Am J Clin Pathol. **1955**;25(8):975-9.
- 60 **Groll AH,** Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K. [Trends in postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital](#). J Infect **1996**; 33:23-32.
- 61 **Guo YL,** Chen YQ, Wang K, Qin SM, Wu C, Kong JL. [Accuracy of BAL galactomannan in diagnosing invasive aspergillosis: a bivariate metaanalysis and systematic review](#). Chest. **2010**;138(4):817-24.
- 62 **Hebart H,** Löffler J, Reitze H, Engel A, Schumacher U, Klingebiel T, Bader P, Böhme A, Martin H, Bunjes D, Kern WV, Kanz L, Einsele H. [Prospective screening by a panfungal polymerase chain reaction assay in patients at risk for fungal infections: implications for the management of febrile neutropenia](#). Br J Haematol. **2000**;111(2):635-40.
- 63 **Held J ,** Schmidt T, Thornton CR, Kotter E, Bertz H. [Comparison of a novel \*Aspergillus\* lateral-flow device and the Platelia® galactomannan assay for the diagnosis of invasive aspergillosis following haematopoietic stem cell transplantation](#). Infection. **2013**;41(6):1163-9.
- 64 **Hendrickson L,** Davis CR, Roach C, Nguyen DK, Aldrich T, McAda PC, Reeves CD. [Lovastatin biosynthesis in \*Aspergillus terreus\*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene](#). Chem Biol. **1999**; 6(7): 429-39.
- 65 **Hinrikson HP,** Hurst SF, Lott TJ, Warnock DW, Morrison CJ. [Assessment of ribosomal large-subunit D1-D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important \*Aspergillus\* species](#). J Clin Microbiol. **2005**;43(5):2092-103.
- 66 **Hohl TM,** Feldmesser M. [Aspergillus fumigatus: principles of pathogenesis and host defense](#). Eukaryot Cell. **2007**;6(11):1953-63.
- 67 **Holland PM,** Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. [Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of \*Thermus aquaticus\* DNA polymerase](#). Proc Natl Acad Sci USA. **1991**;88(16):7276-7280.
- 68 **Hope WW,** Walsh TJ, Denning DW. [Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis](#). Lancet Infect Dis. **2005**; 5: 609-22.
- 69 **Howard SJ,** Cerar D, Anderson MJ, AlBarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC, Laverdiere M, Arendrup MC, Perlin DS, Denning DW. [Frequency and evolution of Azole resistance in \*Aspergillus fumigatus\* associated with treatment failure](#). Emerg Infect Dis. **2009**;15(7):1068-76.
- 70 **Hummel M,** Spiess B, Kentouche K, Niggemann S, Böhm C, Reuter S, Kiehl M, Mörz H, Hehlmann R, Buchheidt D. [Detection of \*Aspergillus\* DNA in Cerebrospinal Fluid from Patients with Cerebral Aspergillosis by a Nested PCR Assay](#). J Clin Microbiol. **2006**; 44(11): 3989-3993.
- 71 **Jahn B,** Koch A, Schmidt A, Wanner G, Gehringer H, Bhakdi S, Brakhage AA. [Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of \*Aspergillus fumigatus\* with altered conidial surface and reduced virulence](#). Infect Immun. **1997**;65(12):5110-7.

- 72 **Jahn B**, Boukhallouk F, Lotz J, Langfelder K, Wanner G, Brakhage AA. [Interaction of human phagocytes with pigmentless \*Aspergillus\* conidia](#). *Infect Immun*. **2000**;68(6):3736-9.
- 73 **Jahn B**, Langfelder K, Schneider U, Schindel C, Brakhage AA. [PKSP-dependent reduction of phagolysosome fusion and intracellular kill of \*Aspergillus fumigatus\* conidia by human monocyte-derived macrophages](#). *Cell Microbiol*. **2002**;4(12):793-803.
- 74 **Johnson GL**, Bibby DF, Wong S, Agrawal SG, Bustin SA. [A MIQE-Compliant Real-Time PCR Assay for \*Aspergillus\* Detection](#). *PLoS One*. **2012**;7(7): e40022.
- 75 **Kang JJ**, Watson RM, Fisher ME, Higuchi R, Gelfand DH, Holland MJ. [Transcript quantitation in total yeast cellular RNA using kinetic PCR](#). *Nucleic Acid Res*. **2000**;28(2):e2.
- 76 **Karageorgopoulos DE**, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME.  [\$\beta\$ -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis](#). *Clin Infect Dis*. **2011**;52(6):750-70.
- 77 **Kawazu M**, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kurokawa M, Chiba S, Motokura T, Hirai H, Ogawa S. [Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a \(1-->3\)-beta-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders](#). *J Clin Microbiol*. **2004**;42(6):2733-41.
- 78 **Kim A**, Nicolau DP, Kuti JL. [Hospital costs and outcomes among intravenous antifungal therapies for patients with invasive aspergillosis in the United States](#). *Mycoses*. **2011**;54(5):e301-12.
- 79 **Kiss Z**, Ward AC, Birkó Z, Chater KF, Biró S. [Streptomyces griseus 45H, a producer of the extracellular autoregulator protein factor C, is a member of the species \*Streptomyces albidoflavus\*](#). *Int J Syst Evol Microbiol*. **2008**;58(Pt 4):1029-31.
- 80 **Kumar A**, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M. [Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock](#). *Crit Care Med*. **2006**;34(6):1589-96.
- 81 **Lai CC**, Hsu HL, Lee LN, Hsueh PR. [Assessment of Platelia \*Aspergillus\* enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis](#). *J Microbiol Immunol Infect*. **2007**;40(2):148-53.
- 82 **Lakowicz JR**. [Principles of fluorescence spectroscopy \(2nd ed.\)](#). New York, NY: Kluwer Acad./Plenum Publ. **1999**;374-443.
- 83 **Lass-Flörl C**, Gunsilius E, Gastl G, Bonatti H, Freund MC, Gschwendtner A, Kropshofer G, Dierich MP, Petzer A. [Diagnosing Invasive Aspergillosis during Antifungal Therapy by PCR Analysis of Blood Samples](#). *J Clin Microbiol*. **2004**;42(9):4154-7.
- 84 **Lass-Flörl C**, Griff K, Mayr A, Petzer A, Gastl G, Bonatti H, Freund M, Kropshofer G, Dierich MP, Nachbaur D. [Epidemiology and outcome of infections due to \*Aspergillus terreus\*: 10-year single centre experience](#). *Br J Haematol*. **2005**;131(2):201-7.
- 85 **Latgé JP**, Kobayashi H, Debeaupuis DP, Diaquin M, Sarfati J, Wieruszkeski JM, Parra E, Bouchara JP, and Fournet B. [Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of \*Aspergillus fumigatus\*](#). *Infect Immun*. **1994**; 62(12): 5424-5433.
- 86 **Latgé JP**. [Aspergillus fumigatus and Aspergillosis](#). *Clin Microbiol Rev*. **1999**; 12(2):310.

- 87 **Latge** JP. [The pathobiology of \*Aspergillus fumigatus\*](#). Trends Microbiol. **2001**;9(8):382-9.
- 88 **Leefflang** MM, Debets-Ossenkopp YJ, Visser CE, Scholten RJ, Hooft L, Bijlmer HA, Reitsma JB, Bossuyt PM, Vandenbroucke-Grauls CM. [Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromized patients](#). Cochrane Database Syst Rev. **2008**;(4):CD007394.
- 89 **Loeffler** J, Hebart H, Cox P, Flues N, Schumacher U, Einsele H. [Nucleic acid sequence-based amplification of \*Aspergillus\* RNA in blood samples](#). J Clin Microbiol. **2001**;39(4):1626-9.
- 90 **Loeffler** J, Mengoli C, Springer J, Bretagne S, Cuenca-Estrella M, Klingspor L, Lagrou K, Melchers WJ, Morton CO, Barnes RA, Donnelly JP, White PL. [Analytical Comparison of In Vitro-Spiked Human Serum and Plasma for PCR-Based Detection of \*Aspergillus fumigatus\* DNA: a Study by the European Aspergillus PCR Initiative](#). J Clin Microbiol. **2015**;53(9):2838-45.
- 91 **Lortholary** O, Gangneux JP, Sitbon K, Lebeau B, de Monbrison F, Le Strat Y, Coignard B, Dromer F, Bretagne S; French Mycosis Study Group. [Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network \(2005-2007\)](#). Clin Microbiol Infect. **2011**;17(12):1882-9.
- 92 **Luther** K, Torosantucci A, Brakhage AA, Heesemann J, Ebel F. [Phagocytosis of \*Aspergillus fumigatus\* conidia by murine macrophages involves recognition by the dectin-1 beta-glucan receptor and Toll-like receptor 2](#). Cell Microbiol. **2007**;9(2):368-81.
- 93 **Lyman** GH, Michels SL, Reynolds MW, Barron R, Tomic KS, Yu J. [Risk of mortality in patients with cancer who experience febrile neutropenia](#). Cancer. **2010**;116(23):5555-63.
- 94 **Maertens** J, Theunissen K, Verbeken E, Lagrou K, Verhaegen J, Boogaerts M, Eldere JV. [Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients](#). Br J Haematol. **2004**;126(6):852-60.
- 95 **Marco** F, Pfaller MA, Messer SA, Jones RN. [Antifungal activity of a new triazole, voriconazole \(UK-109,496\), compared with three other antifungal agents tested against clinical isolates of filamentous fungi](#). Med Mycol. **1998**; 36(6):433-6.
- 96 **Margalit** A, Kavanagh K. [The innate immune response to \*Aspergillus fumigatus\* at the alveolar surface](#). FEMS Microbiol Rev. **2015**;39(5):670-87.
- 97 **Marty** FM, Koo S. [Role of \(1->3\)-beta-D-glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis](#). Med Mycol. **2009**;47 Suppl 1:S233-40.
- 98 **McNeil** M, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA, Plikaytis BD, Warnock DW. [Trends in Mortality Due to Invasive Mycotic Diseases in the United States, 1980–1997](#). Clinical Infectious Diseases **2001**; 33:641–7.
- 99 **Meersseman** W, Vandecasteele SJ, Wilmer A, Verbeken E, Peetermans WE, Van Wijngaerden E. [Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy](#). Am J Respir Crit Care Med. **2004**;15;170(6):621-5.
- 100 **Medzhitov** R. [Recognition of microorganisms and activation of the immune response](#). Nature. **2007**;18;449(7164):819-26.
- 101 **Medzhitov** R, Janeway C Jr. [Innate immune recognition: mechanisms and pathways](#). Immunol Rev. **2000**;173:89-97.
- 102 **Mengoli** C, Cruciani M, Barnes RA, Loeffler J, Donnelly JP. [Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis](#). Lancet Infect Dis. **2009**;9(2):89-96.

- 103 **Mennink-Kersten MA**, Donnelly JP, Verweij PE. [Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis](#). *Lancet Infect Dis*. **2004**;4(6):349-57.
- 104 **Mennink-Kersten MA**, Ruegebrink D, Wasei N, Melchers WJ, Verweij PE. [In vitro release by \*Aspergillus fumigatus\* of galactofuranose antigens, 1,3-beta-D-glucan, and DNA, surrogate markers used for diagnosis of invasive aspergillosis](#). *J Clin Microbiol*. **2006**;44(5):1711-8.
- 105 **Menzin J**, Meyers JL, Friedman M, Perfect JR, Langston AA, Danna RP, Papadopoulos G. [Mortality, length of hospitalization, and costs associated with invasive fungal infections in high-risk patients](#). *Am J Health Syst Pharm*. **2009**;66(19):1711-7.
- 106 **Meyer RD**, Young LS, Armstrong D, Yu B. [Aspergillosis complicating neoplastic disease](#). *Am J Med*. **1973**;54(1):6-15.
- 107 **Michallet M**, Bénet T, Sobh M, Kraghel S, El Hamri M, Cannas G, Nicolini FE, Labussière H, Ducastelle S, Barraco F, Thomas X, Chelghoum Y, Nicolle MC, Bienvenu AL, Persat F, De Monbrison F, Picot S, Vanhems P. [Invasive aspergillosis: an important risk factor on the short- and long-term survival of acute myeloid leukemia \(AML\) patients](#). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **2012**;31(6):991-7.
- 108 **Mikulska M**, Furfaro E, Del Bono V, Gualandi F, Raiola AM, Molinari MP, Gritti P, Sanguinetti M, Posteraro B, Bacigalupo A, Viscoli C. [Galactomannan testing might be useful for early diagnosis of fusariosis](#). *Diagn Microbiol Infect Dis*. **2012**;72(4):367-9.
- 109 **Mikolajewska A**, Schwartz S, Ruhnke M. Antifungal treatment strategies in patients with haematological diseases or cancer: from prophylaxis to empirical, pre-emptive and targeted therapy. *Mycoses*. **2012**;55(1):2-16.
- 110 **Miyazaki T**, Kohno S, Mitsutake K, Maesaki S, Tanaka K, Ishikawa N, and Hara K. [Plasma \(1-->3\)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis](#). *J Clin Microbiol*. **1995**; 33(12): 3115–3118.
- 111 **Mokaddas E**, Burhamah MH, Ahmad S and Khan ZU. [Invasive pulmonary aspergillosis due to \*Aspergillus terreus\*: value of DNA, galactomannan and \(1-3\)-b-D-glucan detection in serum samples as an adjunct to diagnosis](#). *Journal of Medical Microbiology*. **2010** (59):1519–1523.
- 112 **Montagna MT**, De Giglio O, Napoli C, Lovero G, Caggiano G, Delia M, Pastore D, Santoro N, and Specchia G. [Invasive Fungal Infections in Patients with Hematologic Malignancies \(Aurora Project\): Lights and Shadows During 18-Months Surveillance](#). *Int J Mol Sci*. **2012** 13(1): 774–787.
- 113 **Montenegro G**, Sánchez Puch S, Jewtuchowicz VM, Pinoni MV, Relloso S, Temporitti E, Iovannitti CA, Mujica MT. [Phenotypic and genotypic characterization of \*Aspergillus lentulus\* and \*Aspergillus fumigatus\* isolates in a patient with probable invasive aspergillosis](#). *J Med Microbiol*. **2009**;58(Pt 3):391-5.
- 114 **Morton CO**, Loeffler J, De Luca A, Frost S, Kenny C, Duval S, Romani L, Rogers TR. [Dynamics of extracellular release of \*Aspergillus fumigatus\* DNA and galactomannan during growth in blood and serum](#). *J Med Microbiol*. **2010**;59(Pt 4):408-13.
- 115 **Neth O**, Jack DL, Dodds AW, Holzel H, Klein NJ, Turner MW. [Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition](#). *Infect Immun*. **2000**;68(2):688-93.

- 116 **Neofytos D**, Horn D, Anaisse E, Steinbach W, Olyaei A, Fishman J, Pfaller M, Chang C, Webster K, Marr K. [Epidemiology and Outcome of Invasive Fungal Infection in Adult Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy \(PATH\) Alliance Registry](#). *Clinical Infectious Diseases* **2009**; 48:265–73.
- 117 **Nicolle MC**, Bénet T, Thiebaut A, Bienvenu AL, Voirin N, Duclos A, Sobh M, Cannas G, Thomas X, Nicolini FE, De Monbrison F, Piens MA, Picot S, Michallet M, Vanhems P. [Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies: incidence and description of 127 cases enrolled in a single institution prospective survey from 2004 to 2009](#). *Haematologica*. **2011**;96(11):1685-91.
- 118 **Onishi A**, Sugiyama D, Kogata Y, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, Morinobu A, Nishimura K, Kumagai S. [Diagnostic accuracy of serum 1,3-β-D-glucan for pneumocystis jiroveci pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis](#). *J Clin Microbiol*. **2012**;50(1):7-15.
- 119 **Ostrosky-Zeichner L**. Invasive mycoses: diagnostic challenges. *Am J Med*. **2012**;125(1 Suppl):S14-24.
- 120 **Pacholczyk M**, Lagiewska B, Lisik W, Wasiak D, Chmura A. [Invasive fungal infections following liver transplantation - risk factors, incidence and outcome](#). *Ann Transplant*. **2011**;16(3):14-6.
- 121 **Pagano L**, Girmenia C, Mele L, Ricci P, Tost ME, Nosari A, Buelli M, Picardi M, Allione B, Corvatta L, D'Antonio D, Montillo M, Melillo L, Chierichini A, Cenacchi A, Tonso A, Cudillo L, Candoni A, Savignano C, Bonini A, Martino P, Favero AD. [Infections caused by filamentous fungi in patients with hematologic malignancies. A report of 391 cases by GIMEMA Infection Program. GIMEMA Infection Program; Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto](#). *Haematologica* **2001**; 86:862-70.
- 122 **Pagano L**, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino M, Pastore D, Picardi M, Bonini A, Chierichini A, Fanci R, Caramatti C, Invernizzi R, Mattei D, Mitra M E, Melillo L, Aversa F, Van Lint M T, Falucci P, Valentini C G, Girmenia C, Nosari A. [The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study](#). *Hematologica/the Hematology Journal* **2006**; 91(8):1068-75.
- 123 **Pagano L**, Caira M, Nosari A, Van Lint MT, Candoni A, Offidani M, Aloisi T, Irrera G, Bonini A, Picardi M, Caramatti C, Invernizzi R, Mattei D, Melillo L, de Waure C, Reddicono G, Fianchi L, Valentini CG, Girmenia C, Leone G, Aversa F. [Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplants: results of the SEIFEM B-2004 study](#). *Clin. Infect. Dis*. **2007**; 45:1161-70.
- 124 **Pagano L**, Akova M, Dimopoulos G, Herbrecht R, Drgona L, Blijlevens N. [Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients](#). *J Antimicrob Chemother*. **2011**; 66 Suppl 1:i5-14.
- 125 **Paholcsek M**, Leiter E, Markovics A, Biró S. [Novel and sensitive qPCR assays for the detection and identification of aspergillosis causing species](#). *Acta Microbiol Immunol Hung. Acta Microbiol Immunol Hung*. **2014**;61(3):273-84.
- 126 **Paholcsek M**, Fidler G, Konya J, Rejto L, Mehes G, Bukta E, Loeffler J, Biro S. [Combining standard clinical methods with PCR showed improved diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies and prolonged neutropenia](#). *BMC Infect Dis*. **2015**;15:251.
- 127 **Paris S**, Debeauvais JP, Cramer R, Carey M, Charlès F, Prévost MC, Schmitt C, Philippe B, Latgé JP. [Conidial hydrophobins of \*Aspergillus fumigatus\*](#). *Appl Environ Microbiol*. **2003**;69(3):1581-8.

- 128 **Patterson** TF. Risk stratification for invasive aspergillosis: early assessment of host susceptibility. *Med Mycol.* **2009**;47 Suppl 1:S255-60.
- 129 **Peccoud** J, Jacob C. Theoretical uncertainty of measurements using quantitative polymerase chain reaction. *Biophys J.* **1996**;71(1):101-8.
- 130 **Perdelli** F, Cristina ML, Sartini M, Spagnolo AM, Dallera M, Ottria G, Lombardi R, Grimaldi M, Orlando P. Fungal contamination in hospital environments. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **2006**;27(1):44-7.
- 131 **Perlin** DS, Park S. Rapid identification of fungal pathogens: molecular approaches for a new millennium. *Reviews in Medical Microbiology*, **2001**; S13-S20.
- 132 **Perlin** DS. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat.* **2007**;10(3):121-30.
- 133 **Perry** MD, White PL, Barnes RA. Comparison of four automated nucleic acid extraction platforms for the recovery of DNA from *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol.* **2014**;63(Pt 9):1160-6.
- 134 **Quindos** G. New microbiological techniques for the diagnosis of invasive mycoses caused by filamentous fungi. *Clin Microbiol Infect* **2006**; 12 (suppl 7): 40–52.
- 135 **Ramadan** G, Davies B, Kurup VP, Keever-Taylor CA. Generation of Th1 T cell responses directed to a HLA Class II restricted epitope from the *Aspergillus* fl6 allergen. *Clin Exp Immunol.* **2005**;139(2):257-67.
- 136 **Reis e Sousa** C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol.* **2006**;6(6):476-83.
- 137 **Rogers** TR, Haynes KA, Barnes RA. Value of antigen detection in predicting invasive pulmonary aspergillosis. *Lancet.* **1990**;17;336(8725):1210-3.
- 138 **Rogers** TR, Morton CO, Springer J, Conneally E, Heinz W, Kenny C, Frost S, Einsele H, Loeffler J. Combined real-time PCR and galactomannan surveillance improves diagnosis of invasive aspergillosis in high risk patients with haematological malignancies. *Br J Haematol.* **2013**;161(4):517-24.
- 139 **Sales-Campos** H, Tonani L, Cardoso CR, Kress MR. The immune interplay between the host and the pathogen in *Aspergillus fumigatus* lung infection. *Biomed Res Int.* **2013**;2013:693023.
- 140 **Samson** RA, Hoekstra ES, Frisvald JC (eds). *Introduction to Food and Airborne Fungi*. 7th ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, **2004**.
- 141 **Segal** BH, Walsh TJ. Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. *American Journal of respiratory and critical care medicine.* **2006**; 173(7):707-17.
- 142 **Schaffner** A, Douglas H, Braude A. Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. *J Clin Invest.* **1982**;69(3):617-31.
- 143 **Serrano-Gómez** D, Domínguez-Soto A, Ancochea J, Jimenez-Heffernan JA, Leal JA, Corbí AL. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *J Immunol.* **2004**;173(9):5635-43.
- 144 **Serrano-Gómez** D, Leal JA, Corbí AL. DC-SIGN mediates the binding of *Aspergillus fumigatus* and keratinophilic fungi by human dendritic cells. *Immunobiology.* **2005**;210(2-4):175-83.
- 145 **Sinkó** J. *Onkohematológiai és összejt-transzplantált betegek infekcióinak diagnózisa és kezelése*. Doktori (PhD) tézisek. Semmelweis Egyetem. Kilinikai Orvostudományok Doktori Iskola. Budapest, **2011**.

- 146 **Siwek** GT, Pfaller MA, Polgreen PM, Cobb S, Hoth P, Magalheas-Silverman M, Diekema DJ. [Incidence of invasive aspergillosis among allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients receiving voriconazole prophylaxis.](#) *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2006**;55(3):209-12.
- 147 **Slobbe** L, Polinder S, Doorduyn JK, Lugtenburg PJ, el Barzouhi A, Steyerberg EW, Rijnders BJ. [Outcome and medical costs of patients with invasive aspergillosis and acute myelogenous leukemia-myelodysplastic syndrome treated with intensive chemotherapy: an observational study.](#) *Clin Infect Dis.* **2008**;15;47(12):1507-12.
- 148 **Springer** J, Morton CO, Perry M, Heinz WJ, Paholcsek M, Alzheimer M, Rogers TR, Barnes RA, Einsele H, Loeffler J, White PL. [Multicenter comparison of serum and whole-blood specimens for detection of \*Aspergillus\* DNA in high-risk hematological patients.](#) *J Clin Microbiol.* **2013**;51(5):1445-50.
- 149 **Stynen** D, Sarfati J, Goris A, Prévost MC, Lesourd M, Kamphuis H, Darras V, and Latge JP. [Rat monoclonal antibodies against \*Aspergillus\* galactomannan.](#) *Infect Immun.* **1992**; 60(6): 2237–2245.
- 150 **Suarez** F, Lortholary O, Buland S, Rubio MT, GhezD ,Mahé V, Quesne G, . Poirée S, Buzyn A, Varet B, Berche P, and Bougnoux ME. [Detection of Circulating \*Aspergillus fumigatus\* DNA by Real-Time PCR Assay of Large Serum Volumes Improves Early Diagnosis of Invasive Aspergillosis in High-Risk Adult Patients under Hematologic Surveillance.](#) *J Clin Microbiol.* **2008**; 46(11): 3772–3777.
- 151 **Suankratay** C, Kanitcharaskul P, Arunyingmongkol K. [Galactomannan antigenemia for the diagnosis of invasive aspergillosis in neutropenic patients with hematological disorders.](#) *J Med Assoc Thai.* **2006**;89(11):1851-8.
- 152 **Suankratay** C, Kanitcharaskul P, Arunyingmongkol K. [Galactomannan antigenemia for the diagnosis of invasive aspergillosis in neutropenic patients with hematological disorders.](#) *J Med Assoc Thai.* **2006**;89(11):1851-8.
- 153 **Szalai** AJ. [The antimicrobial activity of C-reactive protein.](#) *Microbes Infect.* **2002**;4(2):201-5.
- 154 **Syed** R, Rani R, Sabeena, Masoodi TA, Shafi G, Alharbi K. [Functional analysis and structure determination of alkaline protease from \*Aspergillus flavus\*.](#) *Bioinformation.* **2012**;8(4):175-80.
- 155 **Swilaiman** SS, O'Gorman CM, Balajee SA, Dyer PS. [Discovery of a sexual cycle in \*Aspergillus lentulus\*, a close relative of \*A. fumigatus\*.](#) *Eukaryot Cell.* **2013**;12(7):962-9.
- 156 **Thiel** S. [Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins.](#) *Mol Immunol.* **2007** Sep;44(16):3875-88.
- 157 **Thornton** RC. [Development of an Immunochromatographic Lateral-Flow Device for Rapid Serodiagnosis of Invasive Aspergillosis.](#) *Clin Vaccine Immunol.* **2008**;15(7):1095-105.
- 158 **Tkalcevic** J, Novelli M, Phyalactides J, Iredale P, Segal WA, Roes J. [Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G.](#) *Immunity.* **2000**;12(2):201-10.
- 159 **Torelli** R, Sanguinetti M, Moody A, Pagano L, Caira M, De Carolis E, Fuso L, De Pascale G, Bello G, Antonelli M, Fadda G, Posteraro B. [Diagnosis of invasive aspergillosis by a commercial real-time PCR assay for \*Aspergillus\* DNA in bronchoalveolar lavage fluid samples from high-risk patients compared to a galactomannan enzyme immunoassay.](#) *J Clin Microbiol.* **2011**;49(12):4273-8.

- 160 **Tsitsikas** DA, Morin A, Araf S, Murtagh B, Johnson G, Vinnicombe S, Ellis S, Suaris T, Wilks M, Doffman S, Agrawal SG. [Impact of the revised \(2008\) EORTC/MSG definitions for invasive fungal disease on the rates of diagnosis of invasive aspergillosis.](#) *Med Mycol.* **2012**;50(5):538-42.
- 161 **Varga** J, Samson RA (eds). *Aspergillus in the Genomic Era.* Wageningen: Wageningen Academic Publishers, **2008**.
- 162 **Varga** J, Tóth B, Rigó K, Téren J, Hoekstra RF, Kozakiewicz Z. [Phylogenetic analysis of \*Aspergillus\* section \*Circumdati\* based on sequences of the internal transcribed spacer regions and the 5.8 S rRNA gene.](#) *Fungal Genet Biol.* **2000**;30(1):71-80.
- 163 **Verweij** PE, Stynen D, Rijs AJ, de Pauw BE, J A Hoogkamp-Korstanje, and J F Meis. [Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients.](#) *J Clin Microbiol.* **1995**; 33(7): 1912–1914.
- 164 **Verweij** PE, Weemaes CM, Curfs JH, Bretagne S, Meis JF. [Failure to detect circulating \*Aspergillus\* markers in a patient with chronic granulomatous disease and invasive aspergillosis.](#) *J Clin Microbiol.* **2000**;38(10):3900-1.
- 165 **Vidal** JE, Dauar RF, Melhem MS, Szeszs W, Pukinskas SR, Coelho JF, Lins DL, Costa SF, Penalva de Oliveira AC, Lacaz Cda S. [Cerebral \*Aspergillus fumigatus\* in AIDS patient: First Culture-bizonyított case reported in Brasil.](#) *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São-Paulo* **2005**; 47 (3): 161-165.
- 166 **Von Eiff** M, Roos N, Schulten R, Hesse M, Zühlsdorf M, van de Loo J. [Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival.](#) *Respiration.* **1995**; 62(6):341-7.
- 167 **Walsh** TJ, Roilides E, Cortez K, Kottitil S, Bailey J, Lyman CA. [Control, immunoregulation, and expression of innate pulmonary host defenses against \*Aspergillus fumigatus\*.](#) *Med Mycol.* **2005**;43 Suppl 1:S165-72.
- 168 **Walsh** TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, Morrison VA, Segal BH, Steinbach WJ, Stevens DA, van Burik JA, Wingard JR, Patterson TF; Infectious Diseases Society of America. [Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America.](#) *Clin Infect Dis.* **2008**, 46(3):327-60.
- 169 **Wheat** LJ, Walsh TJ. [Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay.](#) *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **2008**;27(4):245-51.
- 170 **White** PL, Barton R, Guiver M, Linton CJ, Wilson S, Smith M, Gomez BL, Carr MJ, Kimmitt PT, Seaton S, Rajakumar K, Holyoake T, Kibbler CC, Johnson E, Hobson RP, Jones B, Barnes RA. [A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis: a United Kingdom-Ireland evaluation of polymerase chain reaction methods for detection of systemic fungal infections.](#) *J Mol Diagn.* **2006/a**; 8 (3): 376–384.
- 171 **White** PL, Linton CJ, Perry MD, Johnson EM, Barnes RA. [The Evolution of a Whole Blood Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Invasive Aspergillosis in Hematology Patients in a Routine Clinical Setting.](#) *Clin Inf Dis* **2006/b**; 42(4):487-9.
- 172 **White** PL, Perry MD, Loeffler J, Melchers W, Klingspor L, Bretagne S, McCulloch E, Cuenca-Estrella M, Finnstrom N, Donnelly JP, Barnes RA; European *Aspergillus* PCR Initiative. [Critical stages of extracting DNA from \*Aspergillus fumigatus\* in whole-blood specimens.](#) *J Clin Microbiol.* **2010/a**;48(10):3753-5.

- 173 **White PL**, Bretagne S, Klingspor L, Melchers WJ, McCulloch E, Schulz B, Finnstrom N, Mengoli C, Barnes RA, Donnelly JP, Loeffler J; European Aspergillus PCR Initiative. [Aspergillus PCR: one step closer to standardization](#). J Clin Microbiol. **2010**;48(4):1231-40.
- 174 **White PL**, Mengoli C, Bretagne S, Cuenca-Estrella M, Finnstrom N, Klingspor L, Melchers WJ, McCulloch E, Barnes RA, Donnelly JP, Loeffler J; [European Aspergillus PCR Initiative \(EAPCRI\)](#). [Evaluation of Aspergillus PCR protocols for testing serum specimens](#). J Clin Microbiol. **2011**;49(11):3842-8.
- 175 **White PL**, Parr C, Thornton C, Barnes RA. [Evaluation of real-time PCR, galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay \(ELISA\), and a novel lateral-flow device for diagnosis of invasive aspergillosis](#). J Clin Microbiol. **2013**;51(5):1510-6.
- 176 **White PL**, Posso RB, Barnes RA. [Analytical and Clinical Evaluation of the PathoNostics AsperGenius Assay for Detection of Invasive Aspergillosis and Resistance to Azole Antifungal Drugs during Testing of Serum Samples](#). J Clin Microbiol. **2015**;a;53(7):2115-21.
- 177 **White PL**, Barnes RA, Springer J, Klingspor L, Cuenca-Estrella M, Morton CO, Lagrou K, Bretagne S, Melchers WJ, Mengoli C, Donnelly JP, Heinz WJ, Loeffler J. [Clinical Performance of Aspergillus PCR for Testing Serum and Plasma: a Study by the European Aspergillus PCR Initiative](#). J Clin Microbiol. **2015**;b;53(9):2832-7.
- 178 **Wiederhold NP**, Thornton CR, Najvar LK, Kirkpatrick WR, Bocanegra R, Patterson TF. [Comparison of lateral flow technology and galactomannan and \(1->3\)-beta-D-glucan assays for detection of invasive pulmonary aspergillosis](#). Clin Vaccine Immunol. **2009**;16(12):1844-6.
- 179 **Williamson EC**, Oliver DA, Johnson EM, Foot AB, Marks DI, Warnock DW. [Aspergillus antigen testing in bone marrow transplant recipients](#). J Clin Path. **2000**; 53(5): 362–366.
- 180 **Yaguchi T**, Horie Y, Tanaka R, Matsuzawa T, Ito J, Nishimura K. [Molecular phylogenetics of multiple genes on Aspergillus section Fumigati isolated from clinical specimens in Japan](#). Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi. **2007**;48(1):37-46.
- 181 **Youngchim S**, Morris-Jones R, Hay RJ, Hamilton AJ. [Production of melanin by Aspergillus fumigatus](#). J Med Microbiol. **2004**;53(Pt 3):175-81.
- 182 **Zelante T**, Montagnoli C, Bozza S, Gaziano R, Bellocchio S, Bonifazi P, Moretti S, Fallarino F, Puccetti P, Romani L. [Receptors and pathways in innate antifungal immunity: the implication for tolerance and immunity to fungi](#). Adv Exp Med Biol. **2007**;590:209-21.
- 183 **Zelante T**, De Luca A, Bonifazi P, Montagnoli C, Bozza S, Moretti S, Belladonna ML, Vacca C, Conte C, Mosci P, Bistoni F, Puccetti P, Kastelein RA, Kopf M, Romani L. [IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance](#). Eur J Immunol. **2007**;37(10):2695-706.

## 14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt a témavezetőmnek, Prof. Dr. Biró Sándornak tartozom köszönettel, hogy a diákköri, ill. a PhD tanulmányaimat a Humángenetika Tanszéken lehetővé tette. Köszönöm támogatását, egy kiváló embert ismerhettem meg személyében.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Jüergen Loefflernek azért, hogy würzburgi laboratóriumában tölthettem három hónapos, szakmai tanulmányaimat. Köszönjük továbbá azt is, hogy lehetővé tette számunkra az ISHAM-EAPCRI laboratóriumi munkacsoporthoz való csatlakozást, ill. a körkontrollos-vizsgálatokban való folyamatos részvételt.

Kiemelt köszönet illeti Dr. Leiter Évát, Dr. Stágel Anikót, Dr. Birkó Zsuzsannát, Dr. Schmelczer Ivánt, Kosztolányi Katalint, Komárominé Plébán Klárát, Ujszászi Sándort, Fidler Gábort és Markovics Arnoldot. Nagyon köszönöm támogatásokat és barátságokat.

Köszönettel tartozom még Dr. Kónya Józsefnek, Dr. Rejtő Lászlónak, Dr. Karaffa Leventének, Dr. Fekete Erzsébetnek, Dr. Bukta Evelinnek, valamint Németh Lászlónak.

Köszönetet szeretnék mondani minden jelenlegi és korábbi munkatársamnak.

... köszönöm a családomnak

## 15. FÜGGELÉK

### Függelék 1

A kereskedelmi forgalomban kapható szerodiagnosztikai és DNS alapú aszpergillózis diagnosztikai módszerek fontosabb specifikációi szakirodalmi adatok alapján.

SZERODIAGNÓZIS (immunkromatográfia, immunhisztokémia)									
Teszt	Forgalmazó	Leírás	Vizsgált biológiai minta	Biológiai minta térfogata	Kereskedelmi forgalomban kapható:	Diszkrimináció	Szenzitivitás, LoD	Specifititás	Reprodukálhatóság (értékek: 1-5) 5 = nem reprodukálható
Pastorex™ <i>Aspergillus</i>	Sanofi Diagnostics	GM, latex-agglutináció	szérum, plazma	100-200 µl	EU	<i>Aspergillus spp.</i>	LoD: 15-30 ng/µl	magas a fals-pozitívok aránya	3
Fungitell (Glucate) assay	Associates of CAPE COD Inc.	(1,3)-β-D-glukán	szérum	480 µl	EU, USA	<i>Candida spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Pneumocystis jirovecii</i>	LoD: 80 pg/ml Szenzitivitás = 70-100%	nincs keresztreakció	3
Platelia <i>Aspergillus</i>	Bio-Rad Laboratories	GM, szendvics ELISA (EB-A2 monoklonális antitest)	szérum, BAL	300 µl	EU, USA	<i>Aspergillus spp.</i>	LoD: 1ng/ml Szenzitivitás = 20-90%	magas fals-pozitivitás β-laktám antibiotikum kúra esetén Specifititás = 60-85%	3,5
<i>Aspergillus</i> Lateral Flow Device (LFD)	OLM-Medical	Patkány monoklonális antitest (JF5)	szérum, BAL	45 µl	EU	<i>Aspergillus spp.</i>	LoD: 80-98% (PCR-el kombinálva)	84-100 (when combined with PCR)%	3,5
NUKLEINSAV ALAPÚ DETEKTÁLÁS									
Teszt	Forgalmazó	DNS extrakciós kit	Vizsgált biológiai minta	Biológiai minta térfogata	In vitro diagnosztikai használat	real-time PCR platform	Diszkrimináció	Szenzitivitás, LoD	Specifititás
Affigene® <i>Aspergillus</i> tracer	Cepheid	Van. QIAmp DNA mini kit®	whole blood, serum, plasma (ACD, EDTA)	1 ml	IVD	Stratagene iCycler BioRad RotorGene	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. ustus</i>	LoD: 0,54-1,44 GE/ µl	nincs adat
LightCycler®Septifast Test	Roche Diagnostics	HighPure (manuális) MagNa Pure (automata)	extrakciós protokoll függő	extrakciós protokoll függő	RUO (csak kutatási célra használható)	LightCycler 2.0	<i>A. fumigatus</i>	nincs adat	nincs adat
MycAssay <i>Aspergillus</i>	TrinityBiotech-Myconostica	MycXtra DNA extrakció	szérum,	500 µl	IVD	nincs megkötés	<i>Aspergillus spp.</i>	Szenzitivitás = 70%	Specifititás = 90-100%
Artus <i>Aspergillus</i> diff. PCR Kit	Qiagen	QIAamp PurePathogen Blood Kit	teljes vér, szérum	1-3 ml	RUO (csak kutatási célra használható)	nincs, kizárólag Rotor-Gene	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. flavus</i>	Szenzitivitás = 80-100% LoD: 10 kópia/ µl	Specifititás = 70-80%
<i>Aspergillus</i> diagnostics, Debrecen	nincs adat	HighPure (manuális) MagNa Pure (automata)	teljes vér, szérum, BAL	100 µl -2,5 ml	RUO (csak kutatási célra)	automata és manuális Roche platformok	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. lentulus</i>	Szenzitivitás = 80-95%	Specifititás = 80-95%

Az utolsó, sárgán jelölt sorban saját fejlesztésű, aszpergillózis diagnosztikai módszereink rövid jellemzése található.

## Függelék 2

### Kombinált biológiai marker monitorozás ITA követésére.

A monitorozás során végzett *Aspergillus* GM-EIA és *facC*-PCR tesztek száma és megoszlása az egyes, vizsgálatba bevont lázas neutropeniás epizódok esetén.

Epizód ID	Alapbetegség	EORTC/MSG kategória	Biológiai minta száma /epizód	GM-EIA analízisek száma és eredményei		<i>facC</i> -PCR-ek száma és eredményei		PCR futások száma és eredményei	
				+	-	+	-	+	-
1	PTCL	nem bizonyított	8	0	4	1	3	3	9
2	NHL	nem bizonyított	14	0	7	2	5	2	19
3	EM	nem bizonyított	16	0	8	1	7	3	21
4	AML	bizonyított	18	0	7	10	1	18	15
5	EM	nem bizonyított	6	1	2	0	3	0	9
6	AML	nem bizonyított	4	0	2	1	1	1	5
7	AML	bizonyított	4	2	0	2	0	3	3
8	AML	bizonyított	6	1	2	3	0	3	4
9	MM	nem bizonyított	2	0	1	0	1	0	3
10	ALL	valószínű	8	2	0	6	0	13	1
11	EM	nem bizonyított	2	0	1	0	1	0	3
12	EM	nem bizonyított	6	0	3	0	3	0	9
13	AML	valószínű	8	2	2	4	0	8	4
14	AML	nem bizonyított	2	0	1	0	1	0	3
15	MM	nem bizonyított	2	0	1	0	1	0	3
16	EM	bizonyított	6	0	3	1	2	1	8
17	HL	nem bizonyított	4	0	2	0	2	0	6
18	AML	nem bizonyított	2	0	1	1	0	3	0
19	ALL	nem bizonyított	4	0	2	0	2	0	6
20	AML	nem bizonyított	6	0	3	0	3	0	9
21	EM	nem bizonyított	6	0	3	0	3	0	9
22	EM	nem bizonyított	8	0	4	3	1	3	9
23	NHL	nem bizonyított	2	0	1	0	1	0	3
24	AML	nem bizonyított	6	1	2	0	3	0	9
25	NHL	bizonyított	6	2	1	1	2	1	8
26	AML	nem bizonyított	4	0	2	0	2	0	6
27	EM	nem bizonyított	2	0	1	0	1	0	3
Összesen:			162	77		85		249	

Rövidítések: (AML), Akut Myeloid Leukémia; (ALL), Akut Limfoblasztos Leukémia; (HL), Hodgkin Limfóma; (NHL), Non-Hodgkin Limfóma; (MM), Mielóma Multiplex; (PTCL), Perifériás T-sejtes Limfóma; (EM), egyéb malignitások.

## 16. TÁRGYSZAVAK

Invazív aszpergillózis, nukleinsav alapú diagnózis, C faktor ortológ gének, real-time PCR, oladási görbe analízis, galaktomannán, Platelia enzim immuneszé, biomarker monitorozás, körkontrollos vizsgálatok, akut mieloid leukémia

## **17. KEYWORDS**

Invasive aspergillosis, nucleic acid based diagnosis, C factor orthologous genes, real-time PCR, melting point analysis, galactomannan, Platelia enzyme immunoassay, biomarker monitoring, combined diagnosis, cross control studies, acute myeloid leukemia



Nyilvántartási szám: DEENK/142/2015.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Paholcsek Melinda  
Neptun kód: RHYSRR  
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

- Paholcsek, M.**, Fidler, G., Kónya, J., Rejtő, L., Méhes, G., Bukta, E., Loeffler, J., Biró, S.:  
Combining standard clinical methods with PCR showed improved diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies and prolonged neutropenia.  
*BMC Infect. Dis.* 15 (1), 251, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-015-0995-8>  
IF:2.613 (2014)
- Paholcsek, M.**, Leiter, É., Markovics, A., Biró, S.: Novel and sensitive qPCR assays for the detection and identification of aspergillosis causing species.  
*Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 61 (3), 273-284, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/AMicr.61.2014.3.3>  
IF:0.778





---

**További Közlemények**

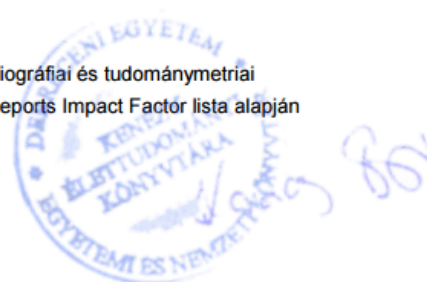
3. Karimi Aghcheh, R., Németh, Z., Atanasova, L., Fekete, E., **Paholcsek, M.**, Sándor, E., Aquino, B., Druzhinina, I.S., Karaffa, L., Kubicek, C.P.: The VELVET A orthologue VEL1 of *Trichoderma reesei* regulates fungal development and is essential for cellulase gene expression.  
*PLoS One*. 9 (11), e112799, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0112799>  
IF:3.234
4. Fekete, E., Karaffa, L., Karimi Aghcheh, R., Németh, Z., Fekete, É., Orosz, A., **Paholcsek, M.**, Stágel, A., Kubicek, C.P.: The transcriptome of *lae1* mutants of *Trichoderma reesei* cultivated at constant growth rates reveals new targets of LAE1 function.  
*BMC Genomics*. 15, Art. No. 447, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-447>  
IF:3.986
5. Springer, J., Morton, C.O., Perry, M., Heinz, W.J., **Paholcsek, M.**, Alzheimer, M., Rogers, T.R., Barnes, R.A., Einsele, H., Loeffler, J., White, P.L.: Multicenter comparison of serum and whole-blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA in high-risk hematological patients.  
*J. Clin. Microbiol.* 51 (5), 1445-1450, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03322-12>  
IF:4.232

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,843**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 3,391**

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

Debrecen, 2015.07.07.



## **EREDETI KÖZLEMÉNYEK**