

Doktori (PhD) értekezés tézise

**Nagyfelbontású olvadási görbe analízisen alapuló
PCR módszer fejlesztése klinikailag releváns
Aspergillus és *Candida* fajok kimutatására**

Fidler Gábor

Témavezető: Dr. Paholcsek Melinda



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola
Debrecen, 2021

**Nagyfelbontású oladási görbe analízisen alapuló PCR módszer fejlesztése klinikailag
releváns *Aspergillus* és *Candida* fajok kimutatására**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: **Fidler Gábor**
okleveles Molekuláris Biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai doktori iskolája
keretében

Témavezető: Dr. Paholcsek Melinda, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora

Dr. Gombos Katalin, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK, In Vitro Diagnosztikai Tömb
nagyelőadó, 2021. július 15. 12.00

Az értekezés bírálói:

Dr. Kredics László, PhD

Dr. Kovács Renátó, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora

Dr. Gombos Katalin, PhD

Dr. Kredics László, PhD

Dr. Kovács Renátó, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK, In Vitro Diagnosztikai Tömb
nagyelőadó, 2021. július 15. 13 óra.

Bevezetés és irodalmi áttekintés

Az opportunista humánpatogén gombafajok által okozott invazív megbetegedések és a rezisztens gombatörzsek egyre növekvő száma egyaránt világméretű gondot jelentenek, amelynek következtében több mint 1.6 millió ember hal meg évente. Kiemelten veszélyeztetett csoportba tartoznak a vérképzőszervi daganatos megbetegedésekben szenvedők, az őssejt- vagy szervtranszplantáción átesettek és a HIV fertőzöttek. Az egyébként is súlyos alapbetegségek szövődményeként fellépő szisztémás gombainfekciók időben megkezdett hatékony antifungális terápia nélkül a betegek életkilátásait jelentősen rontják, továbbá növelik a kórházi ellátás időtartamát illetve annak költségeit.

Az invazív mikózisok fő okozói az *Aspergillus fumigatus* és *Candida albicans* gombafajok, azonban az immunszuppresszív terápiás gyógyszerek, a széles spektrumú antibiotikumok egyre elterjedtebb alkalmazásának illetve olyan egyéb tényezők, mint a klímaváltozás következményeként a két nemzetség más tagjainak előfordulása folyamatosan növekszik. A növekvő tendencia mellett aggasztó, hogy az utóbbi időben a klinikumban megjelent gombatörzsek bizonyítottan eltérő virulenciával és antifungális rezisztencia profillal rendelkeznek. Emiatt az Egyesült Államokban illetve a dél-amerikai régiókban is számoltak már be antimikotikum rezisztens nozokomiális járványokról, melyek igen magas mortalitást mutattak a rizikócsoportba tartozó betegek körében. Mindezeket figyelembe véve a faji szintű diagnózis és a rezisztenciaszűrés kulcsfontosságú, amely hozzájárulhat a megfelelő antifungális szer megválasztásához. Az elsődleges prophylaxis, illetve az empirikus terápiás stratégiák csökkenthetik a mortalitást, ugyanakkor fennáll annak az esélye, hogy szükségtelenül terhelik a betegek szervezetét a súlyosan citotoxikus antifungális gyógyszerekkel. Az invazív gombafertőzések korai felismerése a gyakran aspecifikus tünetek miatt (köhögés, mellkasi fájdalom, láz) kihívás. Legmegfelelőbb klinikai indikátorok közé tartozik az antibiotikumos kezelésre sem szűnő neutropéniás láz. Ennek során a 38°C feletti testhőmérséklet mellett az abszolút neutrofilszám tartósan 500 sejt/mikroliter határérték alá csökken.

A rutin gombadiagnosztikában használt képképző módszerek nem specifikusak, így nem lehet nagy biztonsággal kijelenteni, hogy a képi elváltozás hátterében gombafertőzés áll. A gombák tenyésztése időigényes, és a közeli rokonfajok megkülönböztetése az átfedő morfológiai jegyek miatt ugyancsak kihívás. Annak ellenére, hogy a molekuláris antigén alapú módszerek szenzitív és gyors diagnózist tesznek lehetővé, sem az *Aspergillus* fertőzések

kimutatására kifejlesztett molekuláris „gold standard” galaktomannán ELISA tesztek, sem a pánfungális 1-3- β -D-glükán tesztek nem szolgáltatnak faji szintű eredményt. A gombafajok genetikai azonosítására legelterjedtebben a riboszómális RNS kódoló géneket (18S, 28S) és a köztük elhelyezkedő „*internal transcribed spacer*” (ITS) régiókat használják. Az ITS gének alkalmasak az *Aspergillus* alnemzetségek elkülönítésére, de a különböző *Aspergillus* fajszekciókon belül sokkal pontosabb fajmeghatározást tehetnek lehetővé, amennyiben olyan fehérjekódoló, részben konzervált géneket használnak, mint a *béta-tubulin*, *aktin* vagy *kalmodulin*. Az új-generációs szekvenálás mellett a polimeráz láncreakción (PCR) alapuló módszerek is alkalmazhatók diagnosztikai célokra, de a különböző laborok által fejlesztett esszék és protokollok nagyfokú heterogenitása miatt a standardizáció továbbra is megoldatlan. Ebből kifolyólag e technológiák rutin gombadiagnosztikai felhasználása még mindig kihívást jelent, továbbá a kereskedelmi forgalomban lévő PCR tesztek többnyire csak a fő gombapatogének (*Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*) faji szintű kimutatására összpontosítanak.

A fentebb taglalt tényezőket figyelembe véve igény mutatkozik a klinikai mikológiában olyan nukleinsav alapú diagnosztikai módszerek kidolgozására, melyek az *Aspergillus* illetve *Candida* nemzetségbe tartozó patogének széles tartományát képesek faji szinten meghatározni. A HRM PCR módszert eredetileg genetikai variánsok kimutatására fejlesztették ki, viszont egyre elterjedtebben alkalmazzák különböző baktériumok, vírusok, illetve gombák genetikai azonosítására. Szakirodalmi adatok alapján a gombadiagnosztikai HRM tesztek jelentős többsége szintén az ITS gének kimutatására lett tervezve. Kutatásunk fő célja olyan HRM PCR esszék kifejlesztése és optimalizálása volt, amelyek a gomba β -tubulin gének szekvenciaeltérései alapján lehetővé teszik több klinikailag releváns *Aspergillus* és *Candida* gombafaj egyszerű, gyors és költséghatékony elkülönítését.

Célkitűzés

Alapvető célunk olyan nagyfelbontású olvadási görbe analízisen alapuló nukleinsav gombadiagnosztikai PCR esszék beállítása volt, amelyekkel az *Aspergillus* és *Candida* nemzetségekhez tartozó számos klinikai jelentőségű fontos gombafajt vagyunk képesek azonosítani.

Ehhez kapcsolódóan az alábbi célokat tűztük ki:

- *Aspergillus* és *Candida* gombafajok kimutatására tervezett β -tubulin génekre specifikus primerek *in silico* validálása, amely során referencia adatbázisok szekvenciái alapján vizsgáljuk az esetleges keresztreakciókat.
- HRM PCR reakcióparaméterek beállítása: optimális $MgCl_2$ -, primer koncentráció és anellációs hőmérséklet meghatározása a PCR reakcióhatékonyság maximalizálásához.
- Amplikonok validálása szekvenálással és agaróz gélelektroforézissel.
- *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. lentulus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. welwitschiae*, *A. tubingensis*) és *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*) fajokra specifikus olvadási hőmérséklettartományok meghatározása.
- PCR hatékonyság mérése: analitikai szenzitivitás (Limit of detection: LOD) és a megbízható faji szintű azonosítás (Limit of identification: LOI) tartományának meghatározása.
- Esszék reprodukálhatóságának vizsgálata, inter- és intraesszé variancia meghatározása.
- Esszék keresztreakciójának kísérletes vizsgálata egyéb klinikailag releváns mikroorganizmusokkal.
- Jövőbeni terveink között szerepel az esszék klinikai validálása. Ehhez kapcsolódóan egy olyan felhasználóbarát szoftver fejlesztése, amely gyors és egyszerű kiértékelést tesz lehetővé a klinikai laboratóriumok számára.

Anyagok és módszerek

Referencia törzsek és klinikai izolátumok

A módszer optimalizálás során összesen 104 db gomba- és 16 db baktériumtörzset vizsgáltunk. A klinikai izolátumok a szegedi (SZMC) és a debreceni (DMC) mikrobiológiai gyűjteményekből, a referencia törzsek pedig különböző nemzetközi mikrobiológiai gyűjteményekből származnak: Fungal Genetics Stock Center (FGS); Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal and Yeast Collection (CBS); Northern Regional Research Laboratories (NRRL); American Type Culture Collection (ATCC). A penészgombák közül összesen 43 *Aspergillus* klinikai izolátumot, és 6 *Aspergillus* referencia törzset, az élesztőgombák esetében pedig 38 *Candida* klinikai izolátumot és 5 *Candida* referencia törzset teszteltünk. Keresztreakciókat vizsgáltunk más klinikumban előforduló *Fusarium*, *Scedosporium*, *Lichtemia*, *Rhizopus* gombafajokkal, illetve különböző Gram-pozitív (*Staphylococcus*, *Enterococcus*) és Gram-negatív (*Enterobacter*) baktériumokkal.

A mikroorganizmusok tenyésztése a Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszékével, illetve a Debreceni Egyetem Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszékével együttműködésben történt.

Tenyésztési módszerek

Az *Aspergillus* gombatörzseket először standard minimál nitrát táptalajra szélesztettük, majd a spóráképzését követően, a spórákat folyékony, minimál tápoldatba oltottuk át. Az *Aspergillus fumigatus* és *Aspergillus niger* fajoknál 37 °C-os, az *Aspergillus lentulus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tubingensis* esetében 25 °C-os, míg az *Aspergillus welwitschiae* gombánál 30 °C-os tenyésztési hőmérsékleteket alkalmaztunk. A kultúrákat 18 órán keresztül növesztettük 220 rpm-es rázatással. A *Candida* gombatörzseket két napig tenyésztettük élesztő pepton D-glükóz tápoldatban. A baktériumfajokat Müller-Hinton agar táptalajon tenyésztettük aerob körülmények között.

Spóraszuszpenziós oldatok készítése

Aspergillus és *Candida* gombatörzsek folyékony tenyészeiből tömény spóraszuszpenziós törzsoldatokat készítettünk. A spóraszámot Bürker kamrás sejtszámlálóval határoztuk meg. Ebből az oldatból 7 osztatú 10x-es hígítási sort készítettünk (10^6 -1 spóra/ml) steril nukleáz mentes vízzel (Ambion™, Thermo Fisher Scientific, Maryland, USA).

Sejtek feltárása

A gombasejtek mechanikai líziséhez Green Beads kerámiagyöngyöket (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Svájc), és MagNA Lyser (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Svájc) készüléket használtunk. A feltárást 5000 rpm, 50 másodperc paraméterek mellett végeztük.

A log fázisban lévő baktérium kultúrákból egy milliliternyi 10^8 mennyiségű baktériumsejtet tártunk fel, miután centrifugálással összegyűjtöttük a sejteket. A Gram-pozitív baktériumok esetében a sejtfalat lizozim enzimet tartalmazó lízis koktéllal (20mg/ml enzim 20 mM-os TrisHCl oldatban, pH 8.0, 2 mM EDTA, 1.2% TritonX100) emésztettük.

Genomi DNS extrakció

Az előkísérletekhez, és a keresztreakció vizsgálatához a gombák esetében Masterpure™ Yeast DNA purification kittel (Epicentre Biotechnologies, Madison, USA) izoláltunk genomi DNS-t, míg baktériumoknál a DNS extrakciót E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kittel (Omega Biotechnologies, Norcross, Georgia, USA) végeztük a gyártó utasításai szerint.

A HRM-PCR kísérletekhez a High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Svájc) szilika membrános kitet használtuk, amely nagy kiindulási mintatérfoggal (3-4 ml) használható, ez fontos tényező a vérből történő patogén kimutatás esetén. A DNS kinyerést a gyártó utasításai szerint végeztük, azzal a kiegészítéssel, hogy egy kerámiagyöngyös mechanikai sejtfeltárást iktattunk be. A mechanikai lízishez Green Beads gyöngyöket (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Svájc) és MagNA Lyser (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Svájc) készüléket használtunk 5000 rpm 30 másodperc paraméterekkel.

Az izolált DNS mennyiségét és minőségét minden esetben NanoDrop-1000 spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies Inc., North Carolina, USA) ellenőriztük. Abban az esetben tekintettük az elútumot megfelelőnek, amennyiben az izolált DNS 260/280 abszorbanancia aránya >1.6 a 260/230 arány pedig ≥ 1.8 .

Az *Aspergillus* és *Candida* HRM primerek

Publikus adatbázisokban (EMBL/GeneBank) hozzáférhető annotált *Aspergillus* és *Candida* β -tubulin génszekvenciákban (*benA*, *TUB2*) kerestünk olvadási doméneket. A többszörös szekvenciaillesztést Clustal Omega szoftverrel végeztük. A primer tapadási helyének a variábilis szakaszokat átfogó 30-40 bázis hosszúságú konzervált génrégiókat választottunk,

amelyek lehetővé teszik az *Aspergillus* és *Candida* gombafajok univerzális kimutatását a HRM analízis során.

PCR reakcióparaméterek optimalizálása

A PCR reakciók kivitelezéséhez LightCycler® 480 High Resolution Melting Master mixet (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Svájc) használtunk, amely szaturáló dupla szálú DNS interkaláló LightCycler® 480 ResoLight festéket tartalmazott. Az reakcióparaméterek optimalizálásához az *Aspergillus fumigatus* (AF293) és *Candida albicans* (ATCC 10231) referencia gombatörzseket használtuk, és a LightCycler® 96 (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Svájc) valós idejű kvantitatív PCR készüléket használtuk. A *Candida* HRM PCR esszét LightCycler® 2.0 illetve LightCycler® Nano (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Svájc) készülékekre is optimalizáltuk. A megfelelő PCR reakcióhatékonyság eléréséhez a következő paramétereket állítottuk be:

- **Primer koncentráció:** A HRM primereket 0.2µM-1.5µM végkoncentráció tartományban teszteltük.
- **Anellációs hőmérséklet:** Gradiens PCR reakciókat végeztünk 55-72 °C hőmérséklet tartományban.
- **Optimális MgCl₂ koncentráció meghatározása:** A kalibrálást 1-3.5 mM koncentráció tartományban végeztük a gyártó utasításai szerint.

Az amplifikáció extenziós szakaszában végpontos mérést végzünk, ezzel lehetőségünk van az amplikonok és a mintában található gomba DNS mennyiségének meghatározására. Az olvadáspont analízisre az amplifikációt követően kerül sor, a reakcióközeget fokozatosan melegítve folyamatos méréssel monitorozzuk a fluoreszcens festék felszabadulását, és az amplikonok denaturációját. Az eredmények kiértékelését az *Aspergillus* kísérleteknél kizárólag LightCycler® 96 (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Svájc) szoftverrel, a *Candida* PCR kísérletek esetében pedig mindig az aktuális PCR készülék (LightCycler® 96, LightCycler® 2.0, LightCycler® Nano) dedikált kiértékelő programjával végeztük.

PCR inhibíciós kontroll (SPUD esszé)

PCR inhibíció vizsgálatára a **Nolan** és mtsai. (2006) által leírt SPUD externál inhibíciós kontroll esszét alkalmaztuk, amelyet a *Solanum tuberosum* (burgonya) *phyB* gén (GenBank ID:

Y14572) kimutatására tervezték. A SPUD esszével történő vizsgálatot a *Candida*- és *Aspergillus* HRM módszereinknél használt PCR hőmérsékleti paraméterekkel végezzük, de az interferencia elkerülése végett a fajazonosítástól külön reakcióban. A PCR reakciók során 0.4 μ M primer koncentrációt alkalmazunk, a meghatározott optimális templát mennyiség pedig 200 000 kópia, amely esetében az átlag ciklusszám 21.68 ± 0.29 volt. A SPUD esszéhez tartozó amplikonok olvadási hőmérséklete 80.8 °C.

A HRM PCR amplikonok kísérletes validálása

Konvencionális PCR reakciókat végeztünk *Aspergillus* referenciatörzsekből izolált 20 ng mennyiségű DNS jelenlétében. Az amplifikációhoz Phusion High-Fidelity PCR Master mix-et (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) alkalmaztunk a gyártó utasításai szerint. A PCR készüléken az általunk meghatározott HRM amplifikációs protokollt állítottuk be. A keletkezett amplikonok méretét gélelektroforézissel vizsgáltuk (1% agaróz tartalmú gél, Tris-acetát-EDTA (TAE) pufferben), a DNS festéshez pedig etídium-bromid duplaszálú interkaláló festéket alkalmaztunk. Az egyenirányítón 90V feszültséget, és 55 mA áramerősséget használtunk a futtatáshoz. A fragmenseloszlást az agaróz gélen UV transzilluminátor készülékkel vizsgáltuk. A kapott DNS sávokat a gélből steril szike segítségével kivágtuk, és a géldarabokból visszanyertük a DNS-t QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden Németország) segítségével a gyártó utasításai szerint. A DNS molekulákat ezt követően SigmaSpin™ Sequencing Clean-Up kittel (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) tisztítottuk a gyártó előírásai szerint. Kapilláris szekvenálást végeztünk BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kittel (Thermo Fisher Scientific, Maryland, USA) a gyártó utasításai szerint, ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer készüléken (Applied Biosystems, USA) mindkét irányban.

Candida törzsekből izolált 20 ng mennyiségű genomi DNS jelenlétében végeztünk konvencionális PCR reakciókat LightCycler® Nano (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Svájc) készüléken. Az amplifikációhoz Phusion High-Fidelity PCR Master mix-et (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) használtunk a gyártó utasításai szerint. A PCR készüléken az általunk meghatározott HRM amplifikációs protokollt (V.7: 4. táblázat) állítottuk be. Az amplikonokat agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk (2% agaróz tartalmú gél, Tris-borát-EDTA (TBE) pufferben). A jelöléshez etídium-bromid duplaszálú DNS kötő festéket használtunk. Az egyenirányítón 90 V feszültséget, és 55 mA áramerősséget állítottunk be. A DNS sávokat UV átvilágítással tettük láthatóvá.

Alkalmazott statisztikai módszerek

PCR reakciók kinetikájának jellemzése, dinamikus tartományok meghatározása

Az *Aspergillus* és *Candida* genomi DNS paneleken (10^6 -1 GE/PCR reakció) PCR méréseket, majd lineáris regressziós analízist végeztünk. A kapott Cq értékeket a DNS koncentrációk függvényében ábrázoltuk, és a pontokra egyenest illesztettünk. Az így kapott egyenes egyenletéből meghatároztuk a meredekséget illetve az R^2 értékét, amely annak jellemzésére szolgál, hogy az amplikonok mennyisége ciklusonként exponenciálisan emelkedik-e. Ez utóbbi esetben a változó az 1-es értéket veszi fel, ellenkező esetben az amplikonok mennyisége nem exponenciálisan emelkedik ciklusonként, melynek oka lehet inhibitorok jelenléte a mintában. Az egyenes meredekségéből kiszámolható a PCR hatékonyság a következő egyenlet alapján:

$$\text{Hatékonyság (\%)} = (10^{\frac{-1}{\text{meredekség}} - 1}) \times 100$$

A vizsgálatok során meghatároztuk a detektálási határt (LoD), vagyis azt a legkisebb gomba genomi DNS mennyiséget, amelyet a módszerünk képes kimutatni. Előfordulhat, hogy bár történik amplifikáció, a mintában található DNS mennyisége mégsem elegendő ahhoz, hogy azonosítsuk a gombafajt, így meghatároztuk azt a legkisebb DNS mennyiséget is, amelynél az olvadási görbe és csúcs alapján egyértelműen azonosítható a faj („Limit of identification”: LoI).

Intra- és interaszé variancia vizsgálata

A kísérletek során *Aspergillus* és *Candida* genomi DNS paneleket állítottunk össze, melyek három technikai párhuzamosban tartalmazták a különböző gombatörzseket. A méréseket LightCycler® 96 (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Svájc) készüléken végeztük, és a kapott Cq értékekből meghatároztuk a variációs koefficiens (CV). A PCR esszék esetében kétféle koefficiens különíthető el: a) intra- és b) interaszé variancia. Az első megmutatja a mintapárhuzamosok közti, azaz egy PCR panelen belüli technikai varianciát, amely optimális esetben nem haladhatja meg a 10%-ot. Az utóbbi ezzel szemben a különböző PCR futások közti varianciát fejezi, azaz a mérés reprodukálhatóságát, melynek értéke optimális esetben 15% alatti.

A variációs koefficiens (CV%) a mérések közötti szórások átlagával határozható meg:

$$CV(\%) = \left(\frac{\text{Standard deviáció}}{\text{Átlag}} \right) \times 100$$

Eredmények

Meghatározott optimális HRM PCR reakcióparaméterek

A HRM PCR reakcióparaméterek optimalizálása *A. fumigatus* (Af293) illetve *C. albicans* (ATCC 10231) referencia törzseken történt.

Az optimális MgCl_2 koncentráció mellett az amplifikációs görbék alacsonyabb ciklusszámot és magasabb plató fázist mutattak, ugyanakkor az olvadási csúcsok fluoreszcencia intenzitása a lehető legmagasabb volt. Az *Aspergillus* HRM esszé esetében a 3 mM MgCl_2 bizonyult a legmegfelelőbbnek. A *Candida* HRM esszé vizsgálatakor szintén 3.5 mM MgCl_2 jelenlétében kaptuk a legmagasabb olvadási csúcsot, azonban az amplifikáció 2 mM MgCl_2 -nál volt a leghatékonyabb, mert itt kaptuk a legalacsonyabb ciklusszámot, ezért végül ez volt az optimális.

Az anellációs hőmérsékletet tekintve szintén az amplifikációs görbék voltak a mérvadók. Az *Aspergillus* gombafajokkal végzett kísérletek során az 58 °C-os anellációs hőmérséklet tűnt optimálisnak, de keresztreakciót tapasztaltunk más gombafajokkal, így azt 62 °C-ra megemeltük. A két anellációs hőmérséklet között kevesebb, mint 1 ciklus különbség volt, ezért az amplifikációs hatékonyságra ez a változtatás nem volt jelentős hatással. Emellett az olvadási görbék lefutása mindkét esetben szinte teljesen megegyezett, ezért feltételezzük, hogy az olvadási csúcsokban sem mérhető jelentős eltérés. A *Candida* HRM esszé vizsgálatakor alkalmazott anellációs hőmérsékletek az 55-68 °C-os tartományban egymáshoz közeli amplifikációs görbéket mutattak, azonban 55-58 °C mellett keresztreakciót tapasztaltunk, ezért a 60 °C-os anellációs hőmérséklet volt a megfelelő. A HRM analízis során kapott olvadási görbékben nem találtunk olyan különbségeket, mint amelyet az *Aspergillus* HRM esszé vizsgálatakor tapasztaltunk.

Az *Aspergillus* esszé hatékonysága 0.2-0.2 μM koncentrációjú primerek 1:1 arányú alkalmazásakor volt a legjobb. A *Candida* esszé esetén 0.4 μM primer koncentráció volt az optimális.

HRM PCR ampikonok validálása a meghatározott reakcióparaméterekkel

A *Candida* HRM PCR primerek target régióhoz való specifikus kötődését agaróz gélelektroforézissel igazoltuk. A gélképen mind a hét vizsgált *Candida* fajhoz tartozó PCR termék esetében egy jól körülhatárolt DNS sávot kaptunk, és méretük a 300 bázispáros fragmenshossz tartományba esett, hasonlóan az *in silico* analízis során meghatározott ampikonhosszokkal (281 bp). Aspecifikus termékképződés a gélképen nem volt látható.

Az *Aspergillus* HRM PCR reakcióban két primerpárral (ASP1, ASP2) egyidejűleg sokszorozunk két β -tubulin génszakaszt, ezért indokoltnak tartottuk a módszerrel kimutatott *Aspergillus* fajokhoz tartozó PCR termékek szekvenciájának meghatározását. Ezt kapilláris szekvenálással végeztük, melynek eredményét a **11. ábra** foglalja össze. Az ASP1 primerekkel amplifikált DNS szakaszok átlagos hossza 139.5 ± 1.05 bázispár volt a detektált *Aspergillus* fajtól függően. A PCR reakciók során keletkező amplikonok becsült olvadási hőmérséklete $83.8 - 85.3^\circ\text{C}$ közötti hőmérséklettartományba esett. Az ASP2 primerek esetében megfigyelt PCR termékek átlagos hossza 132 ± 5.97 bázispár volt, és azok becsült olvadási hőmérséklete $79 - 82.2^\circ\text{C}$ közé esett. A meghatározott szekvenciák megegyeztek az NCBI adatbázisban fellelhető referencia szekvenciákkal, így igazoltuk, hogy mindkét primerpár esetében specifikusan a kívánt β -tubulin gén régiókat sokszorosítjuk a PCR reakciók során. Eredményeink alapján ugyanakkor azt is megállapítottuk, hogy a vizsgált *Aspergillus* fajokhoz tartozó célszekvenciák kellően diverzek és azok olvadási hőmérséklete megfelelő mértékű eltérést mutat ahhoz, hogy a HRM PCR módszerrel faji szinten különíthessük el ezeket az *Aspergillus* gombákat.

Az *Aspergillus* HRM PCR olvadási görbék jellemzése

A HRM analízis során az ASP1-ASP2 amplikonokat jellemző, egymással nem átfedő fajspecifikus heteroduplex olvadási csúcsokat azonosítottunk. Az olvadási hőmérsékletek és a csúcstávolságok alapján képesek vagyunk megkülönböztetni az *A. fumigatus*, *A. lentulus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. tubingensis* és *A. welwitschiae* gombafajokat. Az ASP2 olvadási doménre kisebb fluoreszcencia intenzitás és alacsonyabb olvadási hőmérséklettartomány ($81 - 85.60^\circ\text{C}$) jellemző, összehasonlítva az ASP1 olvadási doménnel ($85.61 - 89^\circ\text{C}$). Az *Aspergillus* fajokra jellemző olvadási spektrum ($81 - 89^\circ\text{C}$) hat olvadási klaszterre osztható, melyek közül három klaszter foglalja magába az ASP1 amplikonok olvadási csúcsait (T_m : $85.61 - 89^\circ\text{C}$), további három klaszter pedig az ASP2 amplikonokhoz tartozó olvadási csúcsokat (T_m : $81.00 - 85.60^\circ\text{C}$). Az egyes klasztereket jellemző hőmérséklettartományok a következők: klaszter_1 ($81.00 - 82.72^\circ\text{C}$); klaszter_2 ($82.73 - 83.61^\circ\text{C}$); klaszter_3 ($83.62 - 85.60^\circ\text{C}$); klaszter_4 ($85.61 - 87.10^\circ\text{C}$); klaszter_5 ($87.11 - 87.64^\circ\text{C}$); klaszter_6 ($87.65 - 89.00^\circ\text{C}$). Az ASP1-ASP2 klaszterek kombinációja alapján hét egyedi kétszámjegyű kód rendelhető az egyes *Aspergillus* fajokhoz, amely alkalmas azok elkülönítésére: *A. fumigatus* (1,4), *A. lentulus* (3,4), *A. terreus* (3,6), *A. flavus* (3,5), *A. niger* (2,5), *A. welwitschiae* (1,5) és *A. tubingensis* (2,7).

Vizsgáltuk a fajokhoz tartozó ASP1-ASP2 olvadási doméneket a heteroduplexeken belüli csúcs-távolságok függvényében. A grafikonon két nagyobb csoport különíthető el. Az első csoportba az *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. welwitschiae* fajok tartoznak, melyek olvadási csúcs-hőmérsékleteit leíró pontok szemmel láthatóan jól elkülönülnek egymástól. A második csoportot az *Aspergillus terreus*, *A. flavus* és *A. lentulus* fajok alkotják, melyek között kisebb távolság figyelhető meg. Az *A. lentulus* gombafaj esetében néhány kiugró érték átfedést mutatott az *A. flavus* gombatörzsekkel. Ennek feltehetően mérési hiba lehetett az oka, mert az *A. lentulus* csoport középpontja egyértelműen elkülönül az *A. flavus* értékeitől.

A *Candida* HRM PCR olvadási görbék jellemzése

Eredményeink alapján elmondható, hogy a *Candida* HRM PCR esszé alkalmas hét *Candida* faj genetikai azonosítására az amplikonok közötti olvadási hőmérséklet-különbségek alapján (15. ábra). Legalacsonyabb olvadási hőmérsékletet a *Candida dubliniensis* esetében figyeltünk meg, melyet növekvő sorrendben a *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* és *C. glabrata* követtek. A HRM analízis során meghatározott normalizált olvadási görbék kinetikája (15/A. ábra) és az olvadási csúcsok (15/B. ábra) fajspecifikusnak bizonyultak, amely eredményt a differencia grafikon is alátámasztotta.

A *Candida* HRM esszét három PCR készülékre (Roche LightCycler® 96, Roche LightCycler® Nano, Roche LightCycler® 2.0) optimalizáltuk. Mindhárom PCR platformon sikerült reprodukálni a fajokra jellemző *Candida* olvadási mintázatokat. A készülékek közti technológiai különbségek miatt negatív (LightCycler® 2.0) vagy pozitív (LightCycler® Nano) irányú hőmérséklet eltolódást tapasztaltunk, ezért szükséges volt a HRM analízis során meghatározott referencia értékek újrakalibrálása (16. ábra).

Esszé keresztreakciók egyéb mikroorganizmusokkal

Humán genomi DNS jelenlétében nem tapasztaltunk keresztreakciót egyik HRM esszé esetében sem, azonban a 11 db nem *Aspergillus* illetve *Candida* eredetű gombatörzs és 16 db baktériumtörzs vizsgálatakor a következő megállapításokat tettük:

- ***Aspergillus* HRM PCR esszé:** A *Candida* típusú törzsek (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*) esetében gyenge álpozitivitás volt tapasztalható, ugyanakkor magas DNS templát koncentráció ellenére is alacsony volt az amplifikációs hatékonyság ($C_q > 38$). A

HRM analízis során a *Candida* fajokhoz tartozó olvadási görbék kinetikája a megszokottól eltérő volt, és az amplitkonok olvadási hőmérséklete alacsonyabb volt, mint az *Aspergillus* fajok esetében mért hőmérsékletek ($T_m < 81^\circ\text{C}$). Az *Aspergillus udagawe* és *A. viridinutans* esetében csak egy olvadási csúcsot kaptunk (T_m : $85.38-85.41^\circ\text{C}$; $86.12-86.17^\circ\text{C}$). Szintén egy olvadási csúcsot tapasztaltunk több *Fusarium* gombatörzs vizsgálatakor: *F. napiforme* (T_m : $87.61-87.68^\circ\text{C}$), *F. delphinoides* (T_m : 87.60°C), *F. verticillioides* (T_m : $87.81-87.90^\circ\text{C}$), *F. oxysporum* (T_m : $87.30-87.56^\circ\text{C}$), *F. solani* (T_m : $87.44-87.57^\circ\text{C}$), *F. incarnatum* (T_m : $86.31-86.44^\circ\text{C}$). A két *Scedosporium auranticum* izolátum esetében ugyancsak egy amorf olvadás csúcs volt látható (T_m : $84.11-84.22^\circ\text{C}$).

- **Candida HRM PCR esszé:** Az *Aspergillus* nemzetség vizsgálatakor az *A. fumigatus*, *A. lentulus*, *A. viridinutans* és *A. udagawe* esetében tapasztaltunk esszé keresztreakciót. Ezek olvadási hőmérséklete a *Candida* fajokra jellemző tartomány felett (T_m : $86.35 \pm 0.16^\circ\text{C}$) volt, a kapott olvadási csúcsok nem voltak fajspecifikusak, és egymással átfedést mutattak. Amorf olvadási csúcsokat kaptunk a *Rhizopus oryzae* (T_m : 77.38°C) és *Scedosporium auranticum* (T_m : 75.73°C) fajok esetében, és nagy mennyiségű DNS jelenlétében is igen alacsony amplifikációs hatékonyságot tapasztaltunk.

Az általunk tesztelt baktériumtörzsek (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Enterobacter aerogenes*, *E. gergoviae*, *E. cloacea*) egyikével sem tapasztaltunk keresztreakciót.

Analitikai szenzitivitás és a HRM módszerek megbízhatósága

Dinamikus tartomány, detektálási határ (LoD)

Az *Aspergillus* referencia törzsek esetében az alsó detektálási határ összességében 3pg DNS (10^2 GE) volt (**17. ábra**). Kivételt képezett ez alól az *Aspergillus tubingensis* gDNS panel (LOD: 10 GE), ugyanakkor a HRM analízis során ebben az esetben csak egy olvadási csúcsot kaptunk, ezért ilyen kis koncentrációnál a fajazonosítás a heteroduplex olvadási csúcsok hiányában nem megbízható. A PCR reakciók hatékonyságát lineáris regressziós analízissel határoztuk meg. A kapott regressziós egyenesek meredeksége a vizsgált fajtól függően -3.1714 és -3.6281 értékek közé esett. Az R^2 értéke mindegyik *Aspergillus* faj esetében nagyobb volt, mint 0.99. A reakciók

hatékonysága (E) az *Aspergillus fumigatus* és *Aspergillus lentulus* referencia törzseknél volt a legmagasabb (E: 2.07; 2.05), legalacsonyabb pedig az *A. flavus* esetében (E: 1.89).

A *Candida* HRM PCR esszé szenzitivitását három PCR készüléken is meghatároztuk. A Roche LightCycler® 96 és Roche LightCycler® 2.0 készülékek érzékenysége hasonlóan bizonyult az általunk vizsgált *Candida* referencia gombatörzseken, de a Roche LightCycler® Nano készülék több *Candida* faj esetében is csökkent érzékenységet mutatott. A *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* és *C. krusei* fajoknál az alkalmazott PCR készüléktől függetlenül 10 CFU/ml (0.2 GE/PCR reakció) volt az alsó detektálási határ. Összeségében a *Candida parapsilosis* esetében alacsonyabb szenzitivitást tapasztaltunk (100 CFU/ml). A *Candida guilliermondii* és *C. dubliniensis* fajoknál pedig eltérő szenzitivitást tapasztaltunk a különböző PCR platformokon. A PCR reakciók hatékonysága szinte minden esetben meghaladta az 1.9-es értéket, kivéve a *Candida guilliermondii* faj esetében a LightCycler® 96 és LightCycler® 2.0 platformokon (**18. ábra**).

Fajazonosítás határa (LoI)

Alacsony templát DNS mennyiség mellett sem tapasztaltunk jelentős olvadási hőmérséklet eltolódást egyik HRM PCR esszé esetében sem. Az *Aspergillus* olvadási csúcsok a 10² GE tartományig a fajokra jellemző heteroduplex mintázatot mutatták (**19. ábra**), de alacsonyabb templát DNS mennyiség mellett az ASP1 olvadási csúcs fluoreszcencia intenzitásának csökkenése volt megfigyelhető. A *Candida* HRM PCR esszé vizsgálatokor nem tapasztaltunk DNS templát koncentrációfüggést az olvadási csúcsokban, továbbá hőmérséklet eltolódás sem volt mérhető (**20. ábra**). A fajazonosítás alsó határa (LoI) megegyezett az esszé analitikai szenzitivitásának vizsgálata során meghatározott értékekkel.

HRM PCR módszerek megbízhatósága, intra- és interesszé variancia

Az *Aspergillus* HRM analízis során meghatározott olvadási csúcsok reprodukálhatóságát három klinikai *Aspergillus* genomi DNS panelen vizsgáltuk (**6. táblázat**). A technikai párhuzamosok ASP1-ASP2 olvadási hőmérsékleteinek összesített átlagából kalkulált intraesszé variancia mind a hét *Aspergillus* faj esetében 4% alatt volt. Legnagyobb szórást az *Aspergillus welwitschiae* olvadási hőmérsékletében figyeltünk meg (3.15-3.19%). Az interesszé varianciák szintén nagyon alacsonynak bizonyultak (0.01-0.06%). A variancia értékek átlaga alapján kalkulált teljes variancia 2.48% volt.

A *Candida* HRM esszé megbízhatóságát négy klinikai *Candida* gDNS panelen vizsgáltuk. A klinikai izolátumokhoz tartozó olvadási csúcsok esetében az egy PCR futáson belüli technikai párhuzamosok és a fajokhoz tartozó olvadási hőmérsékletek varianciája egyaránt alacsony volt (0.06-0.21%). Az összesített variancia értéke: 0.12%.

Vizsgáltuk a hét *Candida* referencia törzsön az olvadási hőmérsékletek szórását eltérő DNS templát mennyiség (7.5ng-75fg/10µl) jelenlétében. A kapott olvadási hőmérsékletekben minden esetben 1% alatti szórást tapasztaltunk, és jelentős eltolódást még az alacsony koncentráció tartományokban sem mértünk. A kalkulált intraesszé variancia ezeken a paneleken 0.01-0.2% közötti volt. A teljes esszé variancia szintén alacsonynak bizonyult (0.11%).

MycoAnalyzer kiértékelő szoftver

Kifejlesztésre került egy olyan online applikáció (MycoAnalyzer), amely a HRM PCR eredmények felhasználóbarát és gyors kiértékelését teszi lehetővé. A program a T_m és a C_q értékek megadását követően automatikusan elvégzi a mintában található *Aspergillus* vagy *Candida* gombafaj azonosítását az előre betáplált referencia értékek alapján. A *Candida* HRM esszé esetében lehetőség van a PCR készülék kiválasztására (LightCycler® 96, LightCycler® 2.0, LightCycler® Nano), ekkor az applikáció figyelembe veszi a hőmérséklet eltolódásokat, amely alapján korrekciót végez. Tetszőleges számú minta adható meg, amelyekhez egyedi mintaazonosítók rendelhetők. A program a „Submit” gomb lenyomásával indítható, az eredményeket a „Result” oszlopban olvashatja le a felhasználó. Sikeres fajazonosítás esetén a mintasor zöld színekódot kap, és a program kiírja az azonosított faj nevét. Amennyiben a megadott olvadási hőmérséklet nem szerepel a referencia értékek között, a mintasor piros színekódot kap, és „Not identified *Aspergillus/Candida* species” üzenet jelenik meg. Magas ciklusszám ($C_q > 40$) esetében a mintasor sárga színekóddal figyelmezteti a felhasználót.

Diszkusszió

A humánpatogén gombák gyors és megbízható faji szintű azonosítása napjainkban is komoly kihívást jelent a mikrobiológiai diagnosztikai laborok számára. A gombatenyészetek fenotípus vagy biokémiai jegyek alapján történő karakterizálása időigényes és komplex feladat, ezért nagy igény mutatkozik ezen a területen új, gyors és fajalapú molekuláris diagnosztikai módszerek fejlesztése iránt. A gombadiagnosztikában az idő kulcsfontosságú, ugyanis például a candidémiához köthető mortalitás a fertőzést követő 12 órában akár 20%-al is növekedhet, amennyiben nem kezdik meg a kezelést.

Az invazív mikózisok jelentős százaléka továbbra is az *Aspergillus* és *Candida* nemzetségekhez köthető, azonban a fő kórokozónak számító *Aspergillus fumigatus* illetve *Candida albicans* előfordulása csökkenő tendenciát mutat. Az invazív gombafertőzések legfőbb rizikófaktora az immunszuppresszió, de a technológiai fejlődésnek köszönhető új életmentő orvosi beavatkozások következményeként a gombafertőzések száma továbbra is jelentősen növekszik, és egyre több gombafaj kimutatása válik szükségessé. Az *Aspergillus terreus*, amely mára a harmadik leggyakrabban előforduló invazív aszpergillóizist okozó gombapatogénként ismert, sok esetben elsődleges amphotericin B rezisztenciával rendelkezik. Egy 2004 és 2008 között végzett epidemiológiai tanulmányban megállapították, hogy 5036 candidémiával diagnosztizált beteg közül az esetek közel felében (49,6%) non-*albicans* eredetű fertőzést volt kimutatható, amelyek jelentős százalékában *Candida glabrata*-t azonosítottak. A gombafajok eltérő virulenciája és az antifungális szer érzékenységük miatt a fajalapú diagnózis kiemelt fontosságú. A *Candida* nemzetségen belül már annyira gyakori az antifungális rezisztens törzsek előfordulása, hogy több faj is szerepel a WHO (World Health Organization) és a CDCA (Centers for Disease Control Antibiotic) kockázati listáján. A PCR technikák könnyű kivitelezhetőségük, gyorsaságuk, magas szenzitivitásuk és alacsony költségük miatt jól illeszkednek a gombadiagnosztikába. A nagyfelbontású olvadási görbe analízisen alapuló PCR módszereket a szekvenálás alternatívájaként már sikeresen alkalmazzák baktériumtenyészetek gyors, költséghatékony faji szintű azonosítására.

Ph.D. munkám során nagyfelbontású olvadási görbe (HRM) alapú gombadiagnosztikai PCR esszék kidolgozásában vettem részt, amelyek 14 klinikailag releváns *Aspergillus* és *Candida* gombafaj genetikai elkülönítésére bizonyultak alkalmasnak. Ezen módszerek egyik előnye, hogy a PCR reakció során keletkező amplikonok egyedi fajspecifikus olvadási mintázata

alapján végezzük a fajmeghatározást. Emiatt a fajazonosításhoz nincs szükség a génszekvencia pontos ismeretére, és nem alkalmazunk szekvencia specifikus próbákat sem.

In silico vizsgálatokkal az *Aspergillus* és *Candida* nemzetségek β -tubulin génjén belül olyan régiókat azonosítottunk, amelyek a fajok között kellő mértékű szekvencia eltéréssel rendelkeznek. Ezek alapján a HRM analízisek során fajspecifikus referencia olvadási hőmérséklettartományokat határoztunk meg. Az *Aspergillus* HRM PCR esszé két primerpár alkalmazásával, heteroduplex olvadási csúcsok révén különíti el az *Aspergillus fumigatus*, *A. lentulus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. welwitschiae* és *A. tubingensis* gombafajokat. A *Candida* HRM PCR esszé egy primerpárral képes az *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis* gombákat faji szinten beazonosítani. A primerek specificitását kapilláris szekvenálással illetve agaróz gélelektroforézissel kísérletesen igazoltuk. Az esszék *in vitro* standardizálása során összesen 49 *Aspergillus*- és 42 *Candida* gombatorzset vizsgáltunk. Az *Aspergillus* duplex HRM PCR esszé validálását Roche LightCycler® 96 készüléken végeztük, a *Candida* HRM esszét három különböző PCR platformon (LightCycler® 96, LightCycler® 2.0, LightCycler® Nano) optimalizáltuk. Statisztikailag igazoltuk, hogy HRM PCR esszéink eredményei megbízhatók és jól reprodukálhatóak, jelentős olvadási hőmérséklet eltolódások még alacsony DNS koncentráció mellett sem volt tapasztalható. Az *Aspergillus* HRM esszé esetében meghatározott alsó detektálási limit (LoD) 100 GE, a *Candida* HRM esszé analitikai szenzitivitása (LoD) összességében 10 GE, de a *Candida parapsilosis* esetén csökkent érzékenységet tapasztaltunk (LoD: 100 GE). Ezen felül a LightCycler® Nano készüléken a *Candida parapsilosis* mellett a *C. guilliermondii* és *C. dubliniensis* esetében szintén 100 GE volt az alsó detektálási határ.

Az invazív gombás fertőzések kimutatására irányuló gombadiagnosztikai PCR tesztek a vérből történő direkt patogén kimutatásra összpontosítanak. Ennek oka egyrészt a módszerhez köthető magas szenzitivitás és negatív prediktív érték (amennyiben a beteg nem részesül antifungális prophylaxisban), másfelől pedig több tanulmány is alátámasztja, hogy a gomba nukleinsavak előbb jelennek meg a véráramban, mint például a galaktomannán. Ez lehetővé teszi az invazív aszpergillózis igazolását még GM pozitivitás és a klinikai tünetek megjelenése előtt. **Egger és mtsai** 2020-ban megjelent közleménye átfogó, objektív képet ad ebben a témában, azonban már a klasszikus western-film analógiáját követő cím („Blood Aspergillus: The Good, the Bad and the Ugly”) is találónan szemlélteti, hogy a fent említett erősségek mellett a korlátozó tényezőket is figyelembe kell venni. Ezek közül kiemelendő, hogy vérminták esetében az antifungális prophylaxis jelentősen csökkenti a PCR tesztek diagnosztikai

hatékonyságát. A legtöbb egészségügyi centrum amely hematológiai daganatos megbetegedések kezelésével foglalkozik, a főbb nemzetközi irányelvek ajánlására az antifungális profilaktikus terápiás megközelítést alkalmazza. Az antifungális prophylaxis és az intenzív immunszuppresszív terápiák következményeként a nem *Aspergillus* eredetű penészgombák előfordulása egyre gyakoribb a klinikumban. Emiatt fontos, hogy a PCR diagnosztikai esszék magas analitikai specificitással rendelkezzenek, és képesek legyenek különbséget tenni több *Aspergillus* faj között, ugyanakkor más penészgombákkal ne mutassanak keresztreakciót. Ez azért lényeges, mert a nem *Aspergillus* eredetű fertőzések eltérő antifungális kezelést igényelhetnek, illetve egyes *Aspergillus* fajok eleve polién vagy azol rezisztenciával rendelkezhetnek.

A kereskedelmi forgalomban lévő gombadiagnosztikai PCR tesztek (MycAssay *Aspergillus*, AsperGenius, MycoGenie és SeptiFast PCR) többsége riboszómális lókuszt specifikus univerzális primereket használnak, viszont az *Aspergillus fumigatus* és *Candida albicans* fő gombapatogének mellett csak kevés fajt képesek azonosítani. A megkülönböztetett fajok számát tekintve az *Aspergillus* és *Candida* HRM esszék felül múltak említett tesztek, ugyanakkor szenzitivitásuk alacsonyabb. Éppen ezért elsődleges célunk, a tenyészetek és a hemokultúrákban található gombasejtek faji szintű azonosítása. Előzetes eredményként, hemokultúrából és kanul mintából már sikeresen azonosítottunk *Candida glabrata* és *C. albicans* gombafajokat a *Candida* HRM módszerrel.

A fajazonosítás mellett az antifungális rezisztenciamechanizmusokhoz köthető génmutációk azonosítása is kiemelt fontosságú. A kereskedelmi forgalomban kapható tesztek (AsperGenius, MycoGenie) kizárólag a *Cyp51A* génen belüli azol rezisztencia markerek azonosítására alkalmasak, ugyanakkor például polién (amphotericin B) rezisztenciáról nem adnak tájékoztatást. A HRM módszerek kellően érzékenyek a különböző polimorfizmusok kimutatására, és antifungális rezisztens gombatörzsek azonosítására. Az *ERG11* génmutációhoz köthető azol rezisztens *Candida albicans* törzsek kiszűrésére már sikeresen alkalmazzák a HRM technikát. A MALDI-TOF tömegspektrometria szintén nagyon gyors és hatékony a gombák faji szintű azonosításában, de limitáló tényező, hogy a meghatározás jelenleg csak tiszta tenyészetekből lehetséges, ami napokkal is eltolhatja a diagnózist. A PCR módszerek előnye, hogy patogén kimutatás közvetlenül a klinikai mintákból (szövet, vér, BAL) is lehetséges, azonban a PCR inhibícióból következő álnegatív vagy a környezeti kontaminációból adódó álpozitív eredmények ellenőrzésére különösen a gombadiagnosztikai esszék esetén különösen nagy gondot kell fordítani. Az ubikviter gombák esetében gyakoriak a

laborkontaminációból eredő álpozitív eredmények. Emiatt a DNS kinyerés során használt reagensek tisztaságát megfelelő izolációs kontroll beiktatásával ellenőrizzük, és a PCR reakciók esetében is használunk negatív kontrollokat.

Az *Aspergillus* és *Candida* HRM PCR módszerek kidolgozásakor figyelembe vettük a költséghatékonyságot, egyszerű kivitelezhetőséget és reprodukálhatóságot a nemzetközi irányelveknek megfelelően. Emellett a gombadiagnosztikai HRM PCR módszerek rutin felhasználását támogatva létrehoztunk egy online kiértékelő alkalmazást (MycoAnalyzer), amely felhasználóbarát módon teszi lehetővé a minták elemzését. A dolgozatban leírttól eltérő mintafeldolgozás vagy PCR készülék alkalmazása esetén az olvadási hőmérséklet eltolódás miatt szükséges referencia gombatorzsekkal a rendszer újra kalibrálása, és ebben az esetben a MycoAnalyzer szoftver nem alkalmazható az eredmények kiértékeléséhez. A HRM PCR teszt jól kombinálható más diagnosztikai módszerekkel is anélkül, hogy a költségeket jelentősen megemelné.

Távlati terveink között szerepel a HRM esszék tesztelése betegekből izolált gombatenyészeteken, hemokultúrákon, kanül- és katéter mintákon. Emellett tervezzük a multirezisztens *Candida auris* olvadási mintázatának meghatározását a *Candida* HRM esszével.

Összefoglalva úgy gondoljuk, hogy az általunk kifejlesztett *Aspergillus* és *Candida* HRM PCR esszék olyan alternatívát nyújthatnak a mikrobiológiai laboratóriumok számára, amely lehetővé teszi klinikai jelentőségű gombapatogének egyszerű, gyors és költséghatékony faji szintű azonosítását.

Összefoglalás

Célunk olyan HRM PCR gombadiagnosztikai esszék kifejlesztése és optimalizálása volt, amelyek klinikailag jelentős *Aspergillus* és *Candida* gombafajok genetikai megkülönböztetését teszik lehetővé. A két nemzetség β -tubulin génjén belül *in silico* olyan diverz szekvenciájú régiókat azonosítottunk, melyek egyedi fajspecifikus genetikai ujjlenyomatként szolgáltak a HRM analízis során. Ennek alapján sikerült referencia olvadási hőmérsékleti tartományokat meghatározni az *Aspergillus fumigatus*, *A. lentulus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. welwitschiae*, *A. tubingensis*, és egy második esszé alkalmazásával a *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* fajok esetében. A módszerfejlesztés során a HRM PCR reakcióparamétereket kísérletesen optimalizáltuk, az *Aspergillus* HRM PCR esszét Roche LightCycler® 96 készüléken, a *Candida* HRM PCR esszét pedig három Roche gyártmányú PCR platformon (LightCycler® 96, LightCycler® 2.0, LightCycler® Nano) validáltuk.

Az *Aspergillus* HRM esszé analitikai szenzitivitása összességében 100 GE, a *Candida* HRM esszé érzékenysége ettől jobb, 10 GE volt, kivéve a *Candida parapsilosis* esetében (LOD: 100 GE). A módszer megbízhatóságát a detektálási határ felett kísérletesen és statisztikai módszerrel is igazoltuk. A HRM PCR teszt hasznos lehet az *in vitro* körülmények között lassan növekvő kriptikus gombatörzsek faji szintű azonosításában.

A rutin felhasználás elősegítésének érdekében teljes diagnosztikai protokollt dolgoztunk ki, a sejtek feltárásától a HRM PCR eredmények kiértékeléséig. Az utóbbi tényezőt tekintve fejlesztettük ki a MycoAnalyzer online applikációt, amely lehetővé teszi a minták egyszerű és gyors kiértékelését. Mindemellett a HRM PCR teszt jól kombinálható más diagnosztikai módszerekkel anélkül, hogy a költségeket jelentősen megemelné.

Tekintve a megkülönböztethető fajok számát, az egyszerű illetve gyors kivitelezhetőséget és a költséghatékonyságot módszerünk rendkívül hasznos lehet mikrobiológiai laboratóriumok számára a klinikai *Aspergillus* és *Candida* gombatenyészetek faji szintű azonosításában.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megragadni az alkalmat, hogy köszönetet mondjak mindazoknak, akik hozzájárultak az értekezés létrejöttéhez. Mindenekelőtt hálásan köszönöm témavezetőmnek **Dr. Paholcsek Melindának** és **Prof. Dr. Biró Sándornak** a belém vetett bizalmukat, hogy munkámat lehetővé tették a Humángenetikai Tanszéken, biztosították a kutatásomhoz szükséges anyagi háttérrel, az évek során nyújtott szakmai iránymutatásukat és emberi segítségüket. Sokat tanulhattam tőlük.

Külön köszönet illeti **Dr. Leiter Évát, Dr. Kocsubé Sándort, Dr. Stágel Anikót, Dr. Szabó Juditot, Dr. Majoros Lászlót** és **Dr. Varga Jánost** értékes szakmai segítségükért.

Köszönetet mondok minden korábbi és jelenlegi munkatársamnak.

Végezetül köszönök mindent családomnak, akik mindig mellettem álltak, nélkülük nem jutottam volna el idáig.

Függelék - Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/205/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Fidler Gábor
Neptun kód: SU3X95
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10057432

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Fidler, G.**, Leiter, É., Kocsubé, S., Biró, S., Paholcsek, M.: Validation of a simplex PCR assay enabling reliable identification of clinically relevant *Candida* species.
BMC Infect. Dis. 18 (393), 1-13, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-018-3283-6>
IF: 2.565
2. **Fidler, G.**, Kocsubé, S., Leiter, É., Biró, S., Paholcsek, M.: DNA Barcoding Coupled with High Resolution Melting Analysis Enables Rapid and Accurate Distinction of *Aspergillus* species.
Med. Mycol. 55, 642-659, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myw127>
IF: 2.799





További közlemények

3. Biró, A., Markovics, A., Fazekas, M., **Fidler, G.**, Szalóki, G., Paholcsek, M., Lukács, J., Stündl, L., Gálné Remenyik, J.: Allithiamine Alleviates Hyperglycaemia-Induced Endothelial Dysfunction. *Nutrients*. 12 (6), 1-13, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/nu12061690>
IF: 4.171 (2018)
4. **Fidler, G.**, Tolnai, E., Stágel, A., Gálné Remenyik, J., Stündl, L., Gál, F., Biró, S., Paholcsek, M.: Tendentious effects of automated and manual metagenomic DNA purification protocols on broiler gut microbiome taxonomic profiling. *Sci. Rep.* 10 (1), 1-16, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-60304-y>
IF: 4.011 (2018)
5. 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: 2.69

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16,236

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
5,364**

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

Debrecen, 2020.06.24.

