

# EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

## 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**

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: **Paholcsek Melinda**  
okleveles biotechnológus

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

Témavezető: Prof. Dr. Biró Sándor, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Oláh Éva, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora  
Prof. Dr. Raskó István, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK Humángenetika  
Tanszék, 2014. október 6. 10 óra.

Az értekezés bírálói:

Dr. Bácsi Attila, PhD  
Dr. Sinkó János, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Széll Márta, az MTA doktora  
Dr. Bácsi Attila, PhD  
Dr. Sinkó János, PhD  
Dr. Szabó Judit, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Gyermekgyógyászati Intézet  
Tanterme, 2015. december 7. 13 óra.

## BEVEZETÉS

Az *Aspergillus spp.* az egyik legnagyobb számú gombacsoport. Akad köztük számos, az élő szervezetekre káros hatású növény, állat- és humánpatogén faj is (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus lentulus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*).

Az invazív mikózisok napjainkban továbbra is a fejlett országok legmagasabb morbiditású és mortalitású megbetegedései közé tartoznak. Prevalenciájuk fokozatosan növekedő tendenciát mutat. Szakirodalmi adatok az invazív mikózisban szenvedők számát közel kétmillióra becsülik, és mára már közel annyi ember haláláért felelnek, mint a malária vagy a tuberkulózis.

A mortalitási arány akár 100% is lehet. Bizonyított tény továbbá, hogy bizonyos betegcsoportokban minden, antimikrobiális kezelés nélkül eltelt óra jelentős mértékben képes növelni a mortalitást. Kórházi statisztikák szerint az európai populációban az összes halálozások 7%-áért az *Aspergillus fumigatus*-t tartják felelősnek. Az elmúlt években azonban jelentős mértékben emelkedett az *Aspergillus terreus* által okozott megbetegedések gyakorisága is.

A *Candida* fajok mellett az *Aspergillus*-ok felelősek a leggyakoribb nozokomiális, gombás megbetegedések előidézéséért. A rizikócsoportba immundeficiens betegek, elsősorban kóros, hematólógias (neutrophil sejtek száma  $<500 \times 10^6/\text{liter}$ ) megbetegedésekben szenvedők tartoznak. Különösen az akut mieloid leukémiában (AML) szenvedő betegek vannak kitéve leginkább az infekció veszélyének.

Mivel a gombainfekciók okozta morbiditás jelentősen befolyásolja az onkohematológiai osztályokon kezelt betegek életkilátásait és életminőségét, egyre nagyobb jelentőségre tesz szert a kórházi infekciókontroll.

A megfelelő diagnózis felállítása nehézkes. A megtámadott szövetekben a gombák jelenléte csak időigényes tenyésztéses, vagy hisztopatológiai eljárásokkal, azaz a megfelelő helyről származó biológiai minták, biopsziás mintavételezések (bronchoalveoláris lavage mintavétel; BAL) gombatenyészteteinek elemzésével igazolható kellő biztonsággal.

A szerológiai módszerek az időigényes tenyésztéses eljárásokkal ellentétben akár már három órán belül képesek eredményeket szolgáltatni. Az élővilágban általánosan előforduló gombasejtfal alkotókra szűrnek, így nem alkalmasak az okozó ágensek faji szintű azonosításra, ezért a differenciál diagnózishoz kombinálni kell őket egyéb más, biomarker detektáláson alapuló módszerekkel (leggyakrabban PCR).

A nukleinsav alapú módszerek könnyű kivitelezhetőségüknek, időtakarékoságuknak és jó reprodukálhatóságuknak köszönhetően rendkívül elterjedtek. A megfelelően megtervezett PCR reakciók nemcsak az *Aspergillus*ok genus, hanem akár a species szintű azonosítására is alkalmasak.

Azonban a nem megfelelően kivitelezett, ám rendkívül szenzitív real-time PCR reakciók, az ubiquiter okozó ágensek jelenlétéből adódóan hamis-pozitív eredményekhez és a specificitás romlásához vezethetnek. 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*, *Vancomycin*, *Gentamicin* stb. kezelték.

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. A laboratóriumi munkacsoporti törzstagok 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 összegezza a laboratóriumi és statisztikai munkacsoport új eredményeit a két másik tudományos szervezettel; EBMT-vel (European Society for Blood and Marrow Transplantation), és EORTC-vel (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) együttműködve. Javaslattelevéllel instruálják a DNS alapú aszpergillusz diagnosztika nemzetközi, validációs, kör-kontrollos vizsgálatait.

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. Növekedésük során olyan komplex morfológiai és biokémiai differenciálódási folyamatokon mennek keresztül, melyek sajátosságai szilárd és folyékony táptalajon jelentős eltéréseket mutatnak. Összetett élelciklusuk 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 - törzsének 72 órás tenyészlévéből izolálni, azonosítani, majd génjét klónozni, szekvenálni, és szabályzó hatását vizsgálni. A szekrécióna került fehérje 324 aminosavból áll.

Az érett C faktor fehérje aminosav szekvenciáját PSI-BLAST homológiakereső programokkal vizsgálva hozzá nagyon hasonló ortológ, azaz más fajokban meglévő, vélhetően hasonló funkciójú és közös evolúciós eredettel rendelkező géneket találtunk négy humánpatogén fonalas gombafajban (lásd alább), további két apatogén gombában, egyéb más *Streptomyces* fajokban, ill. néhány Gram-pozitív, nem *Actinomyces*, alacsony G+C tartalmú baktériumban, valamint ezek fágjaiban.

A patogén fonalas gombák közül az *Aspergillus fumigatus* és az *Aspergillus terreus* fajokban található meg a gén. Saját adataink alapján a még nem szekvenált *Aspergillus lentulus* genom is rendelkezik *facC* ortológ génekkel. Ráadásul az *Aspergillus fumigatus* esetében a *C-faktor* génje egyszerre kettő, a hármas és az ötös kromoszómákon is megtalálható.

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.

## 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 meghatározására.
- 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, neutropéniás 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.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### Bioinformatikai módszerek C-faktor homológok keresésére

Az C faktor fehérje aminosav szekvenciáját PSI-BLAST homológia kereső programmal vizsgáltuk. Fehérje adatbázisokban végeztünk keresést a bevitt szekvenciával.

### Taqman<sup>®</sup> MGB és Taqman<sup>®</sup> LNA esszék fejlesztése

Összesen nyolc különböző Taqman<sup>®</sup> hidrolízis esszét (4 Taqman<sup>®</sup>-MGB ill. 4 Taqman<sup>®</sup>-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 megtalálhatóak *facC* ortológ gének, ezért az *Aspergillus fumigatus* diagnosztizáló rendszerek esetében fejlesztettünk ún. dual-copy esszék 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.

### *Aspergillus* fajok tenyésztése és a gDNS kinyerése

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. Patogén gombák felületi tenyészeit mechanikus lízissel folyékony nitrogénben tártuk fel és genomi DNS-t izoláltunk.

### PCR amplifikációs kontrollok

A genomi ekvivalens (GE) egy adott faj egyetlen genomját reprezentáló DNS mennyiségét jelenti. A különböző, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, ill. *Aspergillus lentulus* gDNS koncentrációjú minták real-time rendszerű analízise során minden egyes futás tartalmazott megfelelő belső kontrollokat. Az *Aspergillus fumigatus* Af293 és *Aspergillus terreus* IH2624 haploid genomját (1 GE) 15 fg-nak becsültük.

## **Taqman® MGB és Taqman® LNA esszék reakció hatékonyságának és specificitásának 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. *Aspergillus fumigatus* AF293, *Aspergillus terreus* NCCB IH2624 fajok genomi DNS izolátumaiból 25 tagból álló, 15 ng - 15 fg ( $7\text{-log}_{10}$ ) tartományú hígítási sorozatokat készítettünk nukleázmentes vízben (Ambion PCR grade water). Mintánként három párhuzamos reakcióval dolgoztunk, majd sikeres amplifikációt követően a kapott Cp értékeket átlagoltuk és kalibrációs egyenest illesztettünk 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.

Taqman®-MGB esszéink specificitását vizsgáltuk humán placenta ill. számos prokarióta ill. eukarióta patogén gomba klinikai izolátumainak, valamint apatogén gombák genomi DNS-ével. Taqman®-LNA4 esszék specificitását az ISHAM-EAPCRI által 2013-ban (2013/08/20) kibocsátott körkontrollal paneleken vizsgáltuk.

### **Olvasáspont analízis *Aspergillus fumigatus* és *Aspergillus lentulus* fajok azonosítására**

Az ISHAM-EAPCRI 2013/08/20 körkontrollal 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. Ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy a még nem szekvenált *Aspergillus lentulus* genom is tartalmaz *facC* ortológ gén(ek)e)t. *Aspergillus fumigatus* AFUA\_3G14910, ill. AFUA\_5G00540 gének teljes amplifikációjához primereket terveztünk és *Aspergillus fumigatus* Af293 törzsének gDNS-én optimalizáltuk a gének amplifikációjához szükséges reakció körülményeket. Az *Aspergillus fumigatus* AFUA\_3G14910-génhez tartozó, primerpárral sikeresen amplifikált *Aspergillus lentulus* nukleinsav fragmenteket megszekvenáltattuk, majd megterveztük az *Aspergillus fumigatus* Af293 *facC* ortológ (AFUA\_3G14910), és az *Aspergillus lentulus* SZMC3118 törzs *facC* ortológ génekhez egyaránt hibridizáló PCR primereket, amelyeket a továbbiakban az *Aspergillus fumigatus*, ill. *Aspergillus lentulus* fajok ampikonjainak jellemző szekvencia eltéréseiből adódó olvasáspontjaik, és leolvadási görbéik (HRM analízis) alapján történő azonosítására tervezzük használni.

## **HRM esszé reakció hatékonyságának mérése gDNS paneleken**

*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).

## **Taqman<sup>®</sup> esszék dinamikus tartományának mérése *Aspergillus* konídium tartalmú paneleken**

A biológiai minták (kontroll és panel minták egyaránt) nukleinsav extrakciója Roche MagNA Pure LC 2.0 automata nukleinsav izoláló rendszerben folyt. Hattagú teljes vér paneleket készítettünk Taqman<sup>®</sup>-MGB (Taqman<sup>®</sup>-MGB3, Taqman<sup>®</sup>-MGB4), ill. Taqman<sup>®</sup>-LNA (Taqman<sup>®</sup>-LNA3, Taqman<sup>®</sup>-LNA4) esszéink dinamikus tartományainak meghatározásához. Öttagú, nagyszámú szérum paneleken Taqman<sup>®</sup>-LNA esszéinket tovább teszteltük.

A panelekkel megegyező számú negatív kontroll szérumok analízise folyt. Az extrakciós kontroll minták (ECN-ek) 5%-nál magasabb fals pozitivitása esetén kapott eredményeink nem kerültek kiértékelésre.

A gomba konídiumokat MagNA Lyser (Roche Applied Science) készülékkel és kerámia gyöngyök alkalmazásával, általunk optimalizált protokollnak megfelelően tártuk fel a további felhasználásnak megfelelően 250 µl, ill 1250 µl-ben. Az automata nukleinsav izolálás Roche MagNA Pure LC 2.0 rendszerben zajlott.

A Taqman<sup>®</sup>-MGB real-time PCR amplifikációk az Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR készüléken, míg a Taqman<sup>®</sup>-LNA real-time analízisek a Roche LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II készüléken futottak 20 µl reakció térfogatban és megfelelő PCR-IC, ill. PCR-NTC kontrok beiktatása mellett.

## BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

### Betegpopuláció

2012. június 6 és 2013. május 8 közt eltelt 11 hónap során 27 [16 férfi; átlagéletkor: (év)  $\pm$  (SD) 42.5  $\pm$  21.72 (14-75 év), és 11 nő; átlagéletkor: (év)  $\pm$  (SD) 45.5  $\pm$  15.31 (19-66 év)], 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.

### Eset csoport, kontroll csoport

A klinikus szakemberek a lázas neutropeniás epizódokat az invazív tüdőaszpergillózis (ITA) szempontjából különböző veszélyességi csoportokba (bizonyított ITA, valószínű ITA, lehetséges ITA) sorolták az EORTC-MSG által definiált irányelveknek megfelelően, objektív klinikai, mikrobiológiai (tenyésztés, hemokultúrák, BAL), képalkotó (mellkas CT) és molekuláris (GM szerológia) vizsgálatok eredményeinek figyelembe vételével. A klinikai gyakorlatban megszokottak analógiájára, a „bizonyított ITA és valószínű ITA” kategóriába sorolt epizódok képezték az eset csoportunkat, míg a „lehetséges ITA” kategóriába soroltak a kontroll csoportot.

### 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, illetve minden vizsgálatba bevont epizódról készült mellkas CT vizsgálat. Továbbá, diagnosztikai stratégiánk részeként kombinált biológiai marker-monitorozást végeztünk invazív tüdő aszpergillózis (ITA) detektálására. Lázás neutropeniás betegek szérum mintáit monitoroztuk különböző biológiai target molekulák; galaktomannán (GM) antigén ill. *facC* ortológ génszakaszok jelenlétére Platelia *Aspergillus* GM-EIA szerológia és *facC*-PCR módszerekkel.

A betegek szérumból (3 darab) sárga kupakos, gélszeparátoros csövekbe kerültek levételre, és a Debreceni Egyetem Mikrobiológiai Intézetébe érkeztek a vizsgálatkérő lapokkal együtt.

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 szérumból. GM-EIA eredmények kiértékelését az  $OD_{450/620} \geq 0.5$  pozitívítási cut-off index figyelembe vétele mellett, az előírtaknak megfelelően végezték.

A GM szerológiával párhuzamosan, a nukleinsav alapú diagnózis az általunk optimalizált *C faktor* ortológ gének detektálásán alapuló *facC*-PCR esszéinkkel a Humán Genetika Tanszéken történt. Megfelelő negatív kontrollok beiktatása mellett, már egyetlen pozitív PCR reakció esetén pozitívnak értékeltük az adott biológiai mintát. Ideális esetben adott lázas neutropeniás epizódhoz három *Aspergillus* GM-szerológia és három *facC*-PCR eredmény volt rendelhető.

A lázas állapot antibiotikus kezelés ellenére való fennállta, esetleg pozitív GM-szerológia, ill. pozitív mellkas röntgen esetén végeztek BAL- vizsgálatot is.

A tüdő szövetében tenyésztő gombafonalak megjelenítésére alkalmas eljárás a hematoxylin-eosin (H&E) festés, azonban szöveti nekrosis esetén javasolt további kiegészítő festési eljárások alkalmazása, mint az ugyancsak gomba specifikus Grocott-Gömöri féle methenamine ezüstfestés (GMS), ill. a perjódsvavas (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.

### **Az invazív tüdő aszpergillózis terápiás stratégiája**

Több napon át tartó, széles spektrumú antibiotikum terápiára nem reagáló, esetleg visszatérő láz, egynél több 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.

## ADATELEMZÉS

A statisztikai analízisekbe bevont epizódokat a vizsgált betegség szempontjából, aktuális egészségügyi státuszuknak megfelelően, két alpopulációra bontjuk. Esetekre és kontrollokra. 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).

### ROC analízis

*FacC*-PCR, ill. a GM-EIA módszerek diagnosztikai hatékonyságának méréséhez a tesztek változó (kvantitatív) eredményeit, 77 GM-EIA index és 249 *facC*-PCR Cq megfelelő kvantitatív (pozitív/negatív) eredményekké alakítottuk, alapul véve a mintákat szolgáltató epizódok aktuális egészségügyi állapotát az ITA fertőzés szempontjából (eset csoport és kontrol csoport).

*FacC*-PCR esetében minden PCR futást külön analizáltunk. Szenzitivitási és specificitási mutatókat kalkuláltunk az egyes döntési tartományoknál, majd ROC görbét szerkesztettünk oly módon, hogy a valós pozitív (y tengelyen szenzitivitás értékek) értékeket ábrázoltuk a fals-pozitívok (1-specificitás értékek az x tengelyen) függvényében. Görbe alatti területet számoltunk 95%-os megbízhatósági tartománnyal (95% CI), ill. standard hibával ( $\pm SD$ ). A görbe alatti terület meghatározása mellett számoltunk pozitív és negatív likelihood arányokat ( $LR^+$ ,  $LR^-$ ), ill. pozitív és negatív prediktív értékeket ( $PV^+$ ,  $PV^-$ ) is.

### Vizsgáló módszerek összehasonlítása Kappa-teszttel

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.

## EREDMÉNYEK

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

Az érett C-faktor fehérje aminosav szekvenciáját PSI-BLAST homológia kereső programokkal vizsgáltuk és hozzá nagyon hasonló ortológ, valószínűsíthetően közös evolúciós eredettel rendelkező géneket találtunk többek között az *Aspergillus fumigatus* Af293, *Aspergillus terreus* NIH2624 humánpatogén, fonalas gombafajokban. Az *Aspergillus fumigatus* Af293 genomban egyszerre két példányban, a 3-as (AFUA\_3G14910) és az 5-ös (AFUA\_5G00540) kromoszómán is megtalálhatóak a *C-faktor* ortológ gének. Az *Aspergillus terreus* IH2624 genomban csak egyetlen gén található.

### **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. Majd ezt követően meghatároztuk *Aspergillus fumigatus* Af293 ill. *Aspergillus terreus* IH2624 gDNS tartalmú nukleinsav paneleken az egyes real-time esszéink reakció hatékonyságait, ill. detektációs küszöb (LoD) értékeit. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy Taqman®-LNA3 esszénk bizonyult a legérzékenyebbnek *Aspergillus fumigatus* Af293 (LoD = 1 GE), míg Taqman®-LNA4 esszénk az *Aspergillus terreus* IH2624 (LoD = 1 GE) fajok érzékeny kimutatására.

### **Taqman®-MGB, ill. Taqman®-LNA esszék analitikai specificitása gDNS panelen**

Kísérletesen igazoltuk, hogy az *Aspergillus fumigatus* Af293 és *Aspergillus terreus* IH2624 genomokban található *facC* ortológ génekhez hibridizáló Taqman®-MGB hidrolízis esszék (Taqman®-MGB3, Taqman®-MGB4) nem detektálják sem a másik faj, sem pedig pedig jó néhány egyéb vizsgált faj DNS-ében meglévő *facC* géneket. *Aspergillus fumigatus* specifikus Taqman®-LNA3, valamint az *Aspergillus terreus* specifikus Taqman®-LNA4 esszék analitikai specificitását a 2013-as ISHAM-EAPCRI panelen vizsgáltuk, melynek alapján *Aspergillus fumigatus* ill. *Aspergillus terreus* specifikus esszéink egyetlen esetben sem reagáltak más fajok gDNS-ével egyetlen kivétellel. Az *Aspergillus fumigatus* specifikus Taqman®-LNA3 esszé egy esetben kereszt reakciót mutatott az *Aspergillus lentulus* gDNS-ével.

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

*Aspergillus fumigatus* *facC* ortológokkal (AFUA\_3G14910) nagyfokú hasonlóságot mutató és közel azonos méretű (900-950 bp) génszakaszok meglétét igazoltuk az *Aspergillus lentulus* SZMC3118 genomban. A géneket *Aspergillus fumigatus* *facC* génekhez specifikus primerekkel amplifikáltuk és a kapott ampikonokat megszekvenáltattuk. 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. *Aspergillus fumigatus* Af293 és *Aspergillus lentulus* SZMC3118 genomi DNS tartalmú paneleket készítettünk 7 log<sub>10</sub> tartományban, majd meghatároztuk az *Asperillus*-HRM esszé reakció hatékonyságát, ill. LoD értékeit, valamint az *Aspergillus fumigatus* Af293, ill. *Aspergillus lentulus* SZMC3118 fajok ampikonjainak a jellemző olvadási pontjait, a fajok specifikus azonosítására.

## **Aspergillózis detektáló Taqman® esszék dinamikus tartománya konídium tartalmú biológiai mintákon**

*Aspergillus fumigatus* (Taqman®-MGB3, Taqman®-LNA3) ill. *Aspergillus terreus* (Taqman®-MGB4, Taqman®-LNA4) specifikus, real-time esszék dinamikus tartományát vizsgáltuk konídium tartalmú teljes vér és szérum mintákon 7-5 log tartományban. Nagyszámú minták analizisét követően lineáris regressziót végeztünk és meghatároztuk a különböző Taqman® esszéink dinamikus tartományát. Biológiai minták analizisén végzett eredményeink alapján megállapítható, hogy a Taqman®-LNA hidrolízis esszéink amplifikációs hatékonyságai bizonyultak a legjobbnak, reakció hatékonyságuk optimális tartományon belülre estek (E = 103-107%) a konídium tartalmú teljes vér panelek analizise 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. Taqman®-LNA esszéink diagnosztikai hatékonyságát, ill. dinamikus tartományát nagyszámú szérum mintákon tovább teszteltük. Taqman®-LNA3 real-time esszé reakció hatékonysága konídium tartalmú szérum mintákon 117,54%, míg a Taqman®-LNA4 esszé reakció hatékonysága 107,93% volt.

## **Invazív tüdőaszpergillózis (ITA) infekciókontrollja**

### **Eset csoport, kontrol csoport**

Az egy éves nyomonkövetés során a vizsgálatba bevont 27 beteget EORTC/MSG irányelveknek megfelelően klinikus szakorvos sorolta retrospektív módon az invazív tüdőaszpergillózis (ITA) háromfokozatú kategóriarendszerének - bizonyított, valószínű (eset csoport), ill. nem bizonyított (kontrol csoport) – valamelyikébe.

### **Empirikus antifungális terápia**

A lázas neutropeniás epizódok közül 15 beteg részesült széles spektrumú antifungális terápiában. Az epizódok 60%-áról azonban később kiderült, hogy feleslegesen terhelték szervezetüket az erősen nefro-és hepatotoxikus szerekkel.

### **ITA diagnózisa konvencionális módszerekkel**

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<sup>-</sup>: 0,94. Invazív BAL beavatkozást az epizódok 77%-ában, 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. Eredményeink alapján megállapítható, hogy az invazív BAL módszer a vizsgált 15 epizódot tartalmazó kontrol csoport 93%-ában, azaz egyetlen eset kivételével képes volt kizárni az invazív tüdő aszpergillózist; PV<sup>-</sup>: 0,93.

### **Biológiai marker-monitorozások diagnosztikai pontossága és hatékonysága**

ROC (receiver operating characteristic curves) analízist végeztünk és görbe alatti területet (AUC) számoltunk *Aspergillus* GM és *facC*-PCR diszkriminátorok diagnosztikai pontosságának számításához. 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 ±0.0639, míg a *facC*-PCR teszt esetében „jelentős” 0.8004 (95% CI 0.6976-0.9031); *P* érték < 0.0001 ±0.05243 diagnosztikai pontosságra utalnak.

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.

Cohen féle kappa-statisztikát végeztünk a kétféle diszkriminátor (*Platelia Aspergillus* GM-EIA ill. *facC*-PCR) eredmények konkordanciájának a vizsgálatára. A kappa index értéke ( $K = 0.258$ ), amely a két vizsgált diszkriminátor eredményeinek mérsékelt egyezését mutatta.

### **Túlélési ráták**

Eset-kontroll tanulmányunk teljes túlélési rátája 48.15% volt. A 27 vizsgált betegből 13 halálozott el a nyomonkövetési periódus időszaka során. A 23 GM-EIA negatív beteg 43,47%-a, míg a 4 GM-EIA pozitív beteg 75%-a halálozott el.

### **Három esettanulmány**

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

Az ID-4 epizódot a klinikus az EORTC/MSG kritériumrendszerben leírtaknak megfelelően eredetileg kontroll (lehetséges ITA) csoportba sorolta, 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. A kombinált biomareker 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.

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 tenyésző *Aspergillus* hifák jelenlétét. Ezt az epizódot végül ugyancsak átkategorizálták a kontroll csoportba

Antibiotikumra nem reagáló láz, *Aspergillus* pozitív BAL tenyészet és a háróból 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.

## 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.

Kísérletesen igazoltuk, hogy azon humánpatogén gombafajok közül, melyek a legyengült immunrendszerű egyének szervezetében megtelepedni, idővel generalizálódni, majd szisztémás, invazív fertőzéseket kialakítani képesek, és így biológiai markereik a vérben megjelenhetnek, csak az *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, ill. ahogy arra munkánk során fény derült, az *Aspergillus lentulus* fajok is rendelkeznek *facC* ortológ génekkel. 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.

Nyolc különböző Taqman® real-time, valamint egy HRM esszét fejlesztettünk *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, ill. *Aspergillus lentulus* fajok specifikus és érzékeny detektálására. Méréseink alapján az *Aspergillus fumigatus* specifikus Taqman®-LNA3, ill. az *Aspergillus terreus* specifikus Taqman®-LNA4 real-time esszéink detektálási küszöb értékei bizonyultak a legalacsonyabbnak (LoD = 1 CFU/biológiai minta) különböző konídium tartalmú biológiai paneleken. Az *Aspergillus fumigatus* és *Aspergillus lentulus* fajokat jellemző olvadási görbéjük alapján azonosítani képes HRM esszé klinikai mintákon történő validálása jelenleg is folyamatban van. Az esszé analitikai szenzitivitása különböző, *Aspergillus fumigatus*, ill. *Aspergillus lentulus* gDNS tartalmú paneleken vizsgálva; LoD = 1 GE.

Az elmúlt évek során alkalmunk volt dolgozni szérum, teljes vér, ill. BAL mintákkal egyaránt. A biológiai minták jellegétől függően számos protokollt optimalizáltunk. Teljes vér, ill. BAL minták nukleinsav extrakciójához a kerámia gyöngyös, mechanikai lízissel (Roche, MagNA Lyser) kombinált automata nukleinsav izolálás (Roche, MagNA Pure LC 2.0) bizonyultak a leghatékonyabbnak (módszer-1). Annak ellenére, hogy a teljes vér, ill. BAL minták tartalmazzák az egységnyi térfogatra eső legtöbb gomba nukleinsav molekulát, az elmúlt néhány év során a szérum minták mind hangsúlyosabb szerephez jutottak.

Real-time esszéink analitikai 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.

Eredményeink alapján az *Aspergillus terreus* specifikus Taqman®-LNA4 esszé LoD-értéke nagyon alacsonynak bizonyult. A PCR reakciókban, 18 fg-nyi (1,2 GE) mennyiségben jelen levő *Aspergillus terreus* valamely klinikai izolátumának DNS-ét volt képes detektálni, 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% volt. Azonban az *Aspergillus fumigatus* Taqman®-LNA3 esszé már nem volt képes a PCR reakció 20 µl-ében elméletileg, 1,2 GE-nek megfelelő *Aspergillus fumigatus* valamely klinikai izolátumának DNS-ét detektálni.

Az ISHAM-EAPCRI laboratóriumi munkacsoportjának tagjaként részt vettünk a 2014-es körkontrollos BAL panelek vizsgálatában, amelyek egy része *Aspergillus fumigatus* eredetű nukleinsav molekulákat, míg más részük *Aspergillus fumigatus* konídiumokat tartalmazott különböző koncentrációban.

*Aspergillus fumigatus* konídium, illetve a gDNS panelek analízisével kapott eredményeinket összegezvén megállapítható volt, 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.

Megállapítható továbbá az is, hogy az általunk optimalizált, kerámiagyöngyös-mechanikai lízis lényegesen hatékonyabban tárja fel a biológiai (BAL) mintákban jelen levő *Aspergillus fumigatus* konídiumokat úgy, hogy közben nem roncsolja gomba eredetű nukleinsavakat.

A pontos és korai diagnózis kritikus jelentőségű, hiszen amíg az aszpergillózisos betegek túlélési esélyei jelentős mértékben csökkennek, úgy kezelésük költségei drasztikus mértékben növekszenek a betegség előrehaladtával. A kórházi infekciókontroll és a rizikócsoporthoz tartozók monitorozása abban az esetben lehetne még eredményesebb, ha olyan rutin diagnosztikai módszerek állnának rendelkezésre, amelyek költséghatékonyak, így megfelelő indikáció esetén rendszeres biológiai marker-monitorozást tennének lehetővé.

Annak okán, hogy a különböző súlyos, főleg hematológiai megbetegedésekben (elsősorban akut leukémia) szenvedő betegek, hosszan tartó, elhúzódó neutropéniával, jelentős veszélynek vannak kitéve az invazív tüdőaszpergillózis szempontjából, ezért esetükben kiemelt szerephez jutna a szigorú kórházi infekciókontroll.

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. 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, lehetséges) egyikébe.

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. Megállapítottuk, hogy mind a CT, mind pedig a BAL magas negatív prediktív érték mutatókkal rendelkeznek ( $PV^- = 0.85$ , ill.  $PV^- = 0.93$ ), tehát sokkal inkább alkalmasak az invazív tüdőaszpergillózis kizárására, mint megerősítésére. 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.

Végezetül pedig véleményünk szerint diagnosztikai tesztünket jó eséllyel lehetne kitesítve kereskedelmi forgalomba hozni. A legideálisabb alternatíva az lenne, ha azt zárt, automata rendszerre szabhatnánk (pl. Roche Cobas moduláris rendszer).

## 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, kör-kontrollos 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 eset-kontroll 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). A mért 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 meghozatalára.



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**

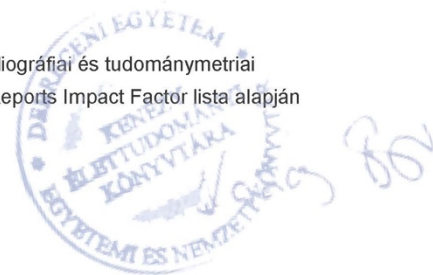
3. Karimi Aghcheh, R., Németh, Z., Atanasova, L., Fekete, E., **Paholcsek, M.**, Sándor, E., Aquino, B., Druzhinina, I.S., Karaffa, L., Kubicek, C.P.: The VELVET A orthologue VEL1 of *Trichoderma reesei* regulates fungal development and is essential for cellulase gene expression.  
*PLoS One*. 9 (11), 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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2015.07.07.



## AZ TÉZIS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK JEGYZÉKE

**Paholcsek M.**, Biró S.: *Aspergillus* diagnostics in Debrecen. 5<sup>th</sup> Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, 2012. január 4-7, Galyatető.

**Paholcsek M.**, Biró S.: Hol tart jelenleg az aszpergillusz diagnosztika Debrecenben és világviszonylatban. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi Nagygyűlése. 2012. október 24-26, Keszthely, Hungary.

**Paholcsek M.**, Biró S.: Statistical aspects of *Aspergillus* diagnosis; Multicenter *Aspergillus* DNA detection in Whole Blood and Serum. 6<sup>th</sup> Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, 2013. január 8-11, Galyatető.

**Paholcsek M.**: Genetic linkage between bacteria and Aspergillosis? A novel invention using highly sensitive and specific TaqMan assays for the identification of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus* species. Invasive Mycoses in Hematological Malignancies VII. 2013. március 22, Universitätsklinikum Würzburg, Zentrum für Innere Medizin, Germany.

**Paholcsek M.**, Biró S.: An alternative way in the diagnosis of aspergillosis; a possible example of translational medicine. 7<sup>th</sup> Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, 2014. január 7-10, Galyatető.

## AZ TÉZIS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ POSZTEREK LISTÁJA

**Paholcsek M.**, Biró S.: Novel methods in *Aspergillus* diagnosis. 4<sup>th</sup> Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, 2011. január 11-14, Galyatető.

Springer J., **Paholcsek M.**, Alzheimer M., Heinz WH., Schloßnagel H., Einsele H, Loeffler J.: Optimized Molecular Diagnosis if Invasive Aspergillosis in Patients after Allogeneic Stem Cell Transplantation – a Second Confirmatory Assay is Crucial. 37<sup>th</sup> Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Le Palais De Congres, 3-6 April 2011, Paris, France

Markovics A., **Paholcsek M.**: Laboratory background of pathogen detection. 7<sup>th</sup> Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, 2013. január 8-11, Galyatető.

Fidler G., **Paholcsek M.**: Diagnostic accuracy of PCR compared to galactomannan in serum samples of invasive systematic aspergillosis. 7<sup>th</sup> Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, 2014. január 7-10, Galyatető.

**Paholcsek M.**, Fidler G., Biró S.: DNA based aspergillosis diagnostics in Debrecen, Hungary; state of the art and further challenges. 6<sup>th</sup> Advances Against Aspergillosis Conference, 2014 február 27-március 1, Madrid, Spain.