

EGYETEMI DOKTORI (Ph. D.) ÉRTEKEZÉS

Majoros László

Candida inconspicua **klinikai izolátumok azonosítása és
érzékenységének vizsgálata flukonazol, amphotericin B, 5-fluorocitozin
és caspofungin iránt**

DEBRECENI EGYETEM ORVOS-ÉS EGÉSZSÉGÜGYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ORVOSI MIKROBIOLÓGIA INTÉZET
DEBRECEN
2005

EGYETEMI DOKTORI (Ph. D.) ÉRTEKEZÉS	1
Fontosabb rövidítések	3
Bevezetés.....	4
Irodalmi áttekintés.....	6
1. Sarjadzó gombák által okozott fertőzések patogenezise	6
2. <i>Candida</i> fajok által okozott megbetegedések.....	8
3. Antifungális szerek csoportosítása, rezisztencia mechanizmusok	9
4. Sarjadzó gombák diagnosztikája	12
5. Sarjadzó gombák érzékenységeinek meghatározása	15
6. Minimális fungicid koncentráció meghatározása.....	18
7. Sarjadzó gombák izolálása a DEOEC Orvosi Mikrobiológiai Intézetében	19
8. <i>Candida inconspicua</i> és a <i>Candida norvegensis</i> fajok jellemzése.....	20
Célkitűzések	22
Anyagok és módszerek.....	23
Eredmények és következtetések.....	27
1. Klinikai izolátumok azonosítása	27
2. Flukonazol iránti érzékenység meghatározása	29
3. Amphotericin B in vitro aktivitása <i>C. inconspicua</i> izolátumok ellen	32
4. Az 5-fluorocitozin iránti érzékenység meghatározása	34
5. Caspofungin iránti érzékenység meghatározása	35
6. Minimális fungicid koncentráció meghatározása.....	37
Az eredmények összefoglalása.....	39
Köszönetnyilvánítás	40
Irodalomjegyzék.....	41
Az értekezésben felhasznált közlemények	51
Egyéb közlemények	52
Fontosabb előadások, poszterek.....	53

Fontosabb rövidítések

AMB	amphotericin B
ATCC	American Type Culture Collection
DÉ	dózisfüggően érzékeny
É	érzékeny
FLU	flukonazol
5-FC	5- fluorocitozin
MÉ	mérsékelten érzékeny
MFC	minimális fungicid koncentráció
MIC	minimális inhibitor koncentráció
R	rezisztens

Bevezetés

A sarjadzó gombák okozta fertőzések száma növekszik. A fertőzések gyakoribbá válása egyrészt statisztikailag is jól igazolható, másrészt egy új, inkább egy divatiránnyal összefüggő, jórészt a betegek öndiagnózisa által felállított, mint megannyi tünetért felelős „népbetegség” következménye.

Sokkal egyértelműbb tényeken alapul a sarjadzó gombák által okozott kórképeknek a szerepe csökkent immunvédekezésű betegeknél, ahol az átlagos mortalitás a 30-40 %-t is eléri. A súlyos, életet veszélyeztető gombafertőzések közel 90%-ért a különböző *Candida* speciesek a felelősek, megelőzve a penészgombákat (54, 67).

A fertőzések szoros összefüggésben vannak az invazív diagnosztikus és terápiás módszerek elterjedésével, a hosszan tartó széles spektrumú antibiotikum kezeléssel, „új” betegcsoportok megjelenésével (AIDS), valamint a daganatok miatt kemoterápiában részesülő betegek tartósan neutropeniás állapotával (24, 27, 37, 39, 41, 54, 55, 78, 95).

Az 1980-as években a leggyakrabban izolált sarjadzó gomba, amelyet egyben a legvirulensebbnek is tartanak a *Candida albicans* volt (26, 105). Az 1990-s évek elején a preventív és a kuratív terápiába bevezetett flukonazol (FLU) jelentős epidemiológiai változást eredményezett az invazív kórfolyamatokból kitenyészett sarjadzó gombák gyakoriságában. A *C. albicans*, bár megtartotta vezető helyét, visszaszorult, míg a többi, nem-*C. albicans* *Candida* species okozta fertőzések száma növekedett (50, 84, 91). Bár ezen egyéb *Candida* speciesek virulenciája kisebb, mint a *C. albicans* virulenciája, betegcsoporttól valamint a sarjadzó gomba primer vagy szekunder rezisztenciájától függően a mortalitás akár a 80 %-t is elérheti neutropeniás betegek disszeminált fertőzései esetén (41, 69, 74, 91, 97).

A ritkábban izolálható sarjadzó gombák esetén mind a gyors és pontos diagnózis mind, pedig a sokszor ismeretlen rezisztencia-viszonyok problémát jelentenek (28, 54, 76, 118). A sarjadzó gombák egy része primer vagy szekunder rezisztenciával rendelkezik az antifungális szerek egy része ellen (54), így ha a pontos fajmeghatározás késik ezzel az adekvát terápia beindítása is, késedelmet szenved. A klinikusok a pontos eredményt sokszor csak a mintavétel után számított ötödik-hatodik napon kapják meg, amikor a beteg esetleg már meg is halt.

Jelenleg a nemzetközi irodalom három olyan fajt ismer, amelyeknek a FLU iránti genetikai (primer) rezisztenciája bizonyított (*Candida krusei*) (80) illetve valószínűsíthető (*Candida inconspicua* és a *Candida norvegensis*) (3, 101, 118). A *C. krusei* esetén bőséges irodalmi adat áll rendelkezésre mind a diagnosztikai problémák mind, pedig a terápiás nehézségekre vonatkozólag (11, 34, 69, 76, 79, 100). Munkám során a DEOEC Orvosi Mikrobiológiai Intézetében az izolált sarjadzó gombák epidemiológiájában bekövetkezett változás miatt lehetőségem volt, hogy a *C. inconspicua* és/vagy *C. norvegensis*, mint a FLU iránt csökkent érzékenységet mutató két faj elkülönítő diagnosztikáját vizsgáljam. Ugyancsak megvizsgáltam az izolált törzsek különböző antifungális szerek iránti érzékenységét, választ keresve a klinikailag is hatásosan alkalmazható terápiára az *in vitro* érzékenységi eredmények alapján.

Irodalmi áttekintés

1. Sarjadzó gombák által okozott fertőzések patogenezise

A sarjadzó gombák eukarióták, amelyeknek két fő megjelenési formája van: az egysejtű és a fonalas alak. A gombák sejtmembránja ergoszterolt is tartalmaz. A sejt alakjáért és fizikai stabilitásáért a vastag sejtfa a felelős. A sejtfa külső rétege főleg mannoproteineket, míg a belső rétege béta-(1,3)-glükán/kitinhálót tartalmaz különböző mannoproteinekkal együtt, lehetséges célpontként szolgálva az antifungális szereknek (67, 118). A sejtfa fő alkotóeleme a glükán, amely a *Saccharomyces* és a *Candida genus* esetén a sejtfa 30-60 %-t adja.

A sarjadzó gombák jelenléte ép immunrendszerrel rendelkező ember esetén ritkán okoz súlyos megbetegedést. A szájüregben, a hüvelyben, a vastagbélben és a bőrön is különböző gyakorisággal a normál flóra részeként megtalálhatóak a különböző *Candida* speciestek (10, 77). A neutrophil granulocyták és a makrofágok döntő szerepet játszanak a sarjadzó, illetve a fonalas gombák elleni védekezésben, amit a neutropeniás betegekben kialakuló invazív fertőzések számának a növekedése is jól jelez (69, 78, 108, 111, 115). Az utóbbi idők kutatási eredményei alapján egyre nyilvánvalóbbá vált, hogy a sarjadzó gombák többféle, jól szabályozott virulencia faktorokkal rendelkeznek (23, 46, 47, 48). A patogenezisre és a virulencia faktorokra vonatkozó ismereteink többségét a *C. albicans*-al végzett kísérletekből ismerjük (10, 23, 45, 46).

A sarjadzó gombák megtelepedését a szervezetben különböző aerob és anaerob baktériumok segítik elő, ahogy azt koaggregációs kísérletekkel a *C. albicans*, a *Candida dubliniensis* és a *Candida tropicalis* esetén már bizonyították (45, 49). A leggyakoribb koaggregációs partnerek a *Fusobacterium nucleatum* és a *Streptococcus gordonii*. Hasonlóan, az eukarióta sejtek felszínén található fibronectin, integrinek, komplementkötő- és agglutinin-szerű receptorok a sarjadzó gombák tapadását segítik (10, 95, 107). A sejt felszíni hidrofobicitás további, az adhézióban szerepet játszó tényező, amint azt Hazen és munkatársai az általuk vizsgált 7 gombafaj esetén kimutatták (43).

A klinikailag jelentős *Candida* speciestek szinte mindegyike képes a különböző felületeken biofilm képzésére (13, 27, 55, 56). A képződött biofilm egyrészt a fertőzés gócaaként szerepelhet, másrészt a biofilm a caspofungin (CAS) kivételével az antifungális szerek számára átjárhatatlan barrier (2, 10, 25, 78, 84).

A sarjadzó sejt-hifa átalakulásnak (dimorfizmus) a szerepe ismert virulencia tényező az invazív *C. albicans* fertőzések patogenezisében (10, 105, 106, 112). A hifát nem képező mutánsok által okozott letalitás *in vivo* állatmodellben kisebb, a makrofágok hatásosabban pusztították a gombákat (98). Az élesztőforma fagocitózisa esetén a mannóz és részben a fukóz receptorok közvetítésével megvalósuló immunválasz a gyulladáshoz vezető citokinek szintjének növekedésével és fokozott öléssel jár együtt (98, 106). A hifának a CR3 és az Fc receptor közvetítésével megvalósuló fagocitózisa viszont fokozott Il-4 és Il-10 termeléssel jár, ahogy azt humán monocita sejtvonalon elvégzett kísérletek igazolták (10). Hifa jelenléte esetén a hatásos Th1 immunválasz helyett az ellenanyagszintet növelő, de a fagocitózist csökkentő Th2-s immunválasz dominál a vesékben, ahogy azt szisztémásan fertőzött egerek esetén Spellberg és munkatársai bizonyították (106).

Felmerült a fenotípusváltásnak is a szerepe a patogenezisben, amikor a fehér teleptípus-opálos teleptípus átalakulás következik be. Szerepe valószínűleg a gazdaszervezethez való alkalmazkodásban van (10, 98).

A szekretált aszpartil proteáz (SAP) enzimek jelenléte *in vitro* és *in vivo* is kimutathatóan növelik a sarjadzó gombák virulenciáját (12, 18, 20-22, 47, 71, 99, 103). A nyálkahártya fertőzése esetén a SAP-1-3 gének, míg az invazív, szisztémás fertőzések esetén a SAP-4-6 gének játszanak fontos szerepet (8, 14, 19, 23, 35, 102). E tények jelzik, hogy a SAP-gének kifejeződése különbözőképpen valósul meg az egyes testtájak fertőzése során.

Hasonlóan, *C. albicans* esetén a foszfolipázok jelenléte kimutathatóan fokozta a letalitást intravénásan fertőzött egerek esetén, valamint a vérből izolált törzsek foszfolipáz termelése nagyobb volt az egyéb testtájokról izolált törzsekéhez képest (48, 95, 98, 105). A foszfolipázt csökkent mértékben termelő mutáns törzsek esetén a szöveti károsítás mértéke szignifikánsan kisebb volt.

Egyéb lehetséges virulencia faktorok szerepe (lipáz enzim, hemolizin termelés, koaguláz enzim jelenléte) kevésbé ismert (40, 46, 63, 66).

2. *Candida* fajok által okozott megbetegedések

A sarjadzó gombák okozta fertőzések az enyhe, bár rendkívül kellemetlen szubjektív tünetekkel járó nyálkahártya fertőzésektől, a súlyos, életet veszélyeztető invazív fertőzésekig terjedhetnek (41, 78, 77, 82). A *C. albicans* a laboratóriumok vizsgálati anyagaiból a minta típusától függetlenül is a leggyakrabban izolálható sarjadzó gomba (24, 26, 41, 50, 64, 87). Mivel az invazív gombafertőzések nagyobb része endogén eredetű (bőr illetve gastrointestinalis kolonizáció) (77) a nem steril testtájak gombaflórájának ismerete fontos segítség lehet az invazív fertőzések eredetének, illetve a sarjadzó gombák rezisztencia viszonyainak a megismerésében.

Az 1990-es évek elejéig a vérből gyakorlatilag csak a *C. albicans* volt izolálható. A preventív terápiára is kitűnően alkalmas, a betegek által nagyobb dózisban is jól tolerált FLU bevezetése a napi rutinba viaszorította a *C. albicans* okozta candidemiák számát, míg növekedett a nem-*C. albicans* *Candidák* okozta candidemiák száma. Az első ilyen tanulmányok alapján hívták fel a figyelmet a *C. krusei* FLU iránti rezisztenciájára (100). Bár a *C. krusei* gyakoribb izolálhatósága a FLU-t gyakran használó kórházi részlegek esetén általában egyértelmű, számos tanulmány kétséget kizáróan bizonyította a FLU használatától független gyakoribb izolálását ennek a tipikusan nozokomiális kórokozónak (24, 69, 100).

A species átrendeződésről tudósító első tanulmányok az USA-ból származtak, de később egyre több országból jelentek meg hasonló közlések (50, 86, 87, 94, 111). A FLU nagymértékű használata miatti szelekció elősegítette különféle antifungális szerek iránt többszörösen rezisztens *C. glabrata*, *C. tropicalis* és az előbb említett *C. krusei* szerepének a növekedését az invazív kórfolyamatokban (37, 54, 56, 80, 89, 100). Megjegyzést érdemel az is, hogy az antifungális terápiában „gold” standardnak tartott amphotericin B (AMB) esetén napjainkban bebizonyosodott, hogy a különböző *Candida* specieseknek fajtól függően magas lehet a MIC értékük (11, 81), és e törzsek egy része toleranciát mutat az AMB iránt (lásd később) (11).

Az újabb adatok szerint nemcsak a felnőtt betegek esetén következett be a species átrendeződés, hanem a gyermekgyógyászati osztályok egy része esetén is (26, 56, 94, 108).

3. Antifungális szerek csoportosítása, rezisztencia mechanizmusok

Előjáróban le kell szögezni, hogy a rendelkezésre álló antifungális szerek száma sokkal kevesebb az antibakteriális szerekhez viszonyítva. Invazív fertőzések esetén a terápia kimenetelét döntően az alapbetegség befolyásolja (kemoterápia, tartós neutropénia, stb.) (82). A sikertelen terápia oka lehet az illető gombafaj primer vagy szekunder rezisztenciája az illető antifungális szer iránt (54, 118). Az *in vitro* érzékenység ellenére nem eradikálható fertőzések mögött a biofilm képződéssel összefüggő klinikai rezisztencia (*C. albicans* és a *C. parapsilosis*) vagy az antifungális szer iránti tolerancia jelensége állhat (54, 84, 118).

A következőkben röviden felsorolom a főbb, szisztémás kezelésre alkalmas antifungális szerek csoportjait, azok hatásspektrumát és a rezisztencia mechanizmusokat, főleg a sarjadzó gombákra fókuszálva.

Polién típusú antifungális szerek

Az AMB tartozik ide. Az ergosterolhoz kötődve pórust képez a sejtmembránon, így a permeabilitást fokozva irreverzibilis károsodást okoz. Sarjadzó gombák között a primer rezisztencia ritka az AMB iránt (*Candida lusitanae*, *Candida guilliermondii* törzsek egy része, és a *Trichosporon beigelii*) (42, 54, 83, 84, 116). Másodlagos rezisztenciát a *C. tropicalis*, a *C. glabrata* és a *C. krusei* fajok esetén jeleztek, ami a sejtmembrán megváltozott ergosterol tartalma miatt jöhet létre (29, 37, 54, 118). A hatásos kezeléshez általában elegendő 2 µg/ml-es szérumszintet a napi 1 mg/kg-os adagolással elérhetjük a súlyosabb mellékhatások (vese, hidegrázás, láz) megjelenése nélkül (38, 82). A lipiddel kombinált AMB készítmények további lehetőséget nyújtanak a szérumban AMB szintjének növeléséhez, kevesebb mellékhatást okozva ezzel a betegek számára (30, 82).

Azol típusú antimikotikumok

Fungisztatikus hatású gombaellenes készítmények, amelyek a sejtmembrán ergosterol szintézisét gátolják (54, 104, 118). A célpont a 14-alfa demetiláz enzim. Az 1990-es évektől kezdve folyamatosan szintetizálják az új, triazol típusú

antimikotikumokat, egyre szélesedő hatásspektrummal (flukonazol, itrakonazol, posakonazol, vorikonazol és ravukonazol).

Az azol típusú szerek közül a legelterjedtebben használt készítmény a FLU, melynek hatásspektruma kiterjed a *Candida* és a *Cryptococcus* genusokra is, de a penészgombákra nem (54, 118). Neutropéniás betegek gombás megbetegedéseinek a profilaxisára akár hosszú időn keresztül is jól alkalmazható relatíve kevés mellékhatása miatt. Bizonyított primer rezisztenciával a *C. krusei* törzsek (80) és a *C. glabrata* törzsek egy része (118) rendelkezik FLU iránt. Az utóbbi 7-8 évben limitált számú *in vitro* és *in vivo* adat alapján a *C. inconspicua* és a *C. norvegensis* esetén szintén felvetődött a primer rezisztencia lehetősége (3, 101). FLU iránt szekunder rezisztencia hosszan tartó kezelések során szokott kifejlődni, főleg a *C. albicans*, *C. dubliniensis* és a *C. glabrata* fajok esetén (118). A rezisztencia leggyakoribb okai közé a gyógyszert eltávolító, aktív transzportot igénylő mechanizmusok (aktív efflux), a lanosterol demetiláz mutációján alapuló megváltozott target illetve az enzim túltermelése állhat (54, 118). A rezisztencia mechanizmusok kombinálódhatnak is. Az új, azol típusú antifungális szerek spektruma hasonló az FLU-hoz, és általában a penészgombák ellen is jó *in vitro* és *in vivo* aktivitást mutatnak (54). Megjegyzést érdemel, hogy a régi és az új típusú azol származékok között változó mértékű keresztrezisztencia van (91, 118).

Nukleinsav szintézis-gátló antimikotikumok

A csoportnak egyetlen tagja az 5 fluorocitozin (5-FC). A szert a citozin permeáz juttatja be a gombasejtbe, ahol 5-fluorouracillá, majd 5 fluor-deoxi-uridilsavvá alakul. A hatás végső soron a timidilát szintetáz gátlása, leállítva ezzel a DNS szintézisét (114, 118). A napi átlagos dóziszú (100 mg/kg), 3-4 részre osztott terápia mellett a 35-70 µg/ml-es szérumszint megfelelő az 5-FC-ra érzékeny kórokozók kezelésére (33, 114). Monoterápia esetén könnyen szekunder rezisztencia alakulhat ki, ezért főleg AMB-vel kombinálva alkalmazzák (54, 114). A primer rezisztenciával rendelkező törzsek száma a legújabb, több mint 8000 darab sarjadzó gomba vizsgálata alapján nem jelentős, főleg a *C. krusei* esetén figyelhető meg (88). Hasonló eredményeket kaptak Barchiesi és munkatársai is, bár ők kevesebb izolátumot vizsgáltak munkájuk során (5).

Sejtfal szintézist gátló antifungális szerek

Az ide tartozó gyógyszerek a sejtmembránban található, a sejtfal glukán komponensének a szintézisében szerepet játszó glukán szintetáz enzimet gátolják (25, 54). Az echinocandinok közé tartozó caspofungin és micafungin jelenleg már elérhető a klinikumban invazív és egyéb terápiára nem reagáló candidiázisok kezelésére (54, 82). Keresztrezisztencia nem áll fenn a többi antifungális szerrel szemben (54). Rapid fungicid hatású szerek, amit flow-citométerrel történt vizsgálatok is igazoltak (54). Klinikai izolátumok esetén rezisztenciát eddig csupán hosszan tartó kezelés után észleltek (54). Relatív magas MIC értéket *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* és *C. lusitaniae* izolátumok esetén figyeltek meg (25, 54). A magasabb MIC értékek ellenére a CAS *in vivo* hatásnak bizonyult 20 betegből 14 beteg esetén *C. parapsilosis* okozta candidemia kezelése során (25). Jóváhagyott módszer a CAS iránti érzékenység vizsgálatára jelenleg nem áll rendelkezésre (6, 52, 90).

4. Sarjadzó gombák diagnosztikája

Invazív gombafertőzések esetén a diagnosztika nagyon nehéz. A hemokultúráknak kevesebb, mint 50%-a pozitív csupán, egyéb testtájuk esetén, pedig a kolonizáció és a valódi patogén szerep eldöntése sokszor problémás lehet (77, 78, 82). A klinikai kép alapján a neutropeniás, széles spektrumú antibiotikummal kezelt betegek esetén a perzisztáló láz, negatív tenyésztési eredmény esetén is valószínűsíti az invazív gombafertőzést (82). A rendelkezésre álló diagnosztikai módszerek kombinálása (esetleg invazív mintavételi eljárásokkal kiegészítve) eredményesebbé tehetik a diagnosztikát, és lehetőséget nyújtanak a célzott antifungális terápiára (82).

Sarjadzó gombák diagnosztikája hagyományos diagnosztikai módszerek segítségével

A rutin diagnosztikában a sarjadzó gombák azonosítását néhány egyszerű módszerrel az esetek többségében könnyen el lehet végezni. A Sabouraud-táptalajon nőtt tenyészetből főtális borjúszerumban történő inkubálás után a képződött csíratömlő vagy a rizsagaron képzett klamidospóra karakterisztikus a *C. albicans* és a *C. dubliniensis* fajok esetén (7, 110, 117). A kevert tenyészetek felismerését és a 4 leggyakoribb *Candida* faj elkülönítését nagymértékben megkönnyíti a CHROMagar *Candida* differenciáló táptalaj (51, 110). A napjainkban igen elterjedt kereskedelmi tesztek a gombák szénhidrát asszimilációs profilja alapján segítenek a faj meghatározásában. E tesztek egy része nem igényli a sarjadzó gombák morfológiai vizsgálatául szolgáló rizs vagy kukorica táptalajra történő leoltását sem (36, 79, 93, 110), bár a hifa/pszeudohifa morfológiája jellemző az adott gombafajra (79). Ezeknél a teszteknel a biokémiai reakciók összegzésével egy számkódot kapunk (biokód), amit a gyártó által rendelkezésre bocsátott adatbázissal összehasonlítva megkapjuk a biokémiai reakciók által legvalószínűbb faj nevét. Magyarországon és Európában is gyakran használják az ID 32C vagy az API 20C gyári panelek valamelyikét. A több centrumban elvégzett, az ismert *Candida* fajok pontos azonosítását célzó vizsgálatok kimutatták, hogy jól működő laboratóriumok esetén is gyakori (fajtól függően) a téves azonosítás az előbb említett két módszer esetén (79, 93). Téves azonosítás még a leggyakrabban előforduló *C. albicans* esetén is előfordul. Igen gyakori a FLU iránt csökkent érzékenységet mutató triász, a *C. krusei*, *C. inconspicua* és a *C. norvegensis* fajainak téves azonosítása a hagyományos módszerek alapján (79).

Az előbb említett hagyományos módszerek még a sarjadzó gombák diagnosztizálásában jártas laboratóriumok esetén is legalább 3-4 napot vesznek igénybe a pontos, fajszintű azonosításhoz. A hagyományos módszerek tehát önmagukban nem mindig elegendőek a gyors és pontos identifikáláshoz, ezért egyéb módszerek bevezetése is indokolt az adekvát terápia érdekében.

Sarjadzó gombák diagnosztikája szerológiai módszerek segítségével

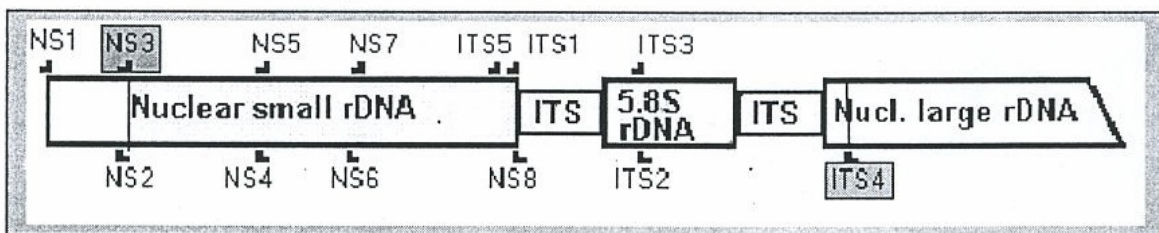
Az invazív sarjadzó gomba fertőzések szerológiai diagnosztikájában, a sejtfolban található proteinek és szénhidrátok jöhetnek szóba (67). A fehérjetermészetű antigének közül széleskörűen vizsgálták a különböző hő sokk proteinek (hsp), a szekretált aszpartil proteázok, az enoláz és a fibrinogén-kötő sejtfol mannoпротеin (mp58) alkalmazhatóságát a diagnosztikában. A hsp90 és az enoláz elleni antitestek kimutatása ELISA módszerrel jelenleg reményt keltő módszer, különösen többszörös mintavétel esetén. A vérben keringő mannán és az ellene termelt ellenanyag egyidejű kimutatása egyes tanulmányok szerint 93 %-s specifitással és 80 %-s érzékenységgel rendelkezik, így szerepe a közeljövőben növekedni fog az invazív gombafertőzések diagnosztikájában (67). Az eddigi eredmények megerősítése nagyobb számú klinikai eset bevonásával jelenleg is tart (67).

Sarjadzó gombák diagnosztikája molekuláris biológiai módszerek segítségével

Mivel a hagyományos módon történő species meghatározáshoz legalább 48-72 óra szükséges, valamint a szerológiai módszerek nem eléggé érzékenyek az invazív sarjadzó gomba fertőzések detektálására, a DNS analízisen alapuló gyors, szenzitív és specifikus eljárások egyre jobban előtérbe kerülnek (57, 58). A kutatások során számos módszert alkalmaznak, pl. restrikciós fragmenthossz polimorfizmus vizsgálata (RFLP) (76, 119, 120), Southern-hibridizációs analízis (31, 65), transzfer RNS profil analízis (65), mitokondriális DNS analízis (122), véletlenszerűen amplifikált polimorf DNS analízise (RAPD) (57, 58, 62, 76).

Az RFLP analízist, ha amplifikált rDNS darabokon végezzük el, ribotipizálásról beszélünk. Ribotipizálás során restrikciós enzimekkel végzünk hasítást majd gélelektroforézissel elválasztjuk a DNS-darabokat, amelyek a fajra jellemző mintázatot adnak. A módszer genetikai alapja az, hogy a gombák riboszómális RNS (rRNS) génei tandem módon ismétlődnek és minden ismétlődés tartalmazza a 18S, az 5.8S és a 26S

rRNS génjeit. Két másik régió is megtalálható, melyet az előző szakaszok fognak közre: az internal transcribed spacer (ITS) régió és az intergenic spacer (IGS) régió. Az rRNS-t kódoló régiók bázissorrendjüket tekintve konzervatívak, míg az ITS-szekvenciák változékonyak, egy genuson belül is nagy variabilitást mutatnak (1. ábra). A konzervatív bázissorrendű szakaszok alkalmas helyet biztosítanak a primerek kapcsolódásához, a közrefogott szakaszok amplifikálása során nyert DNS-részek viszont variábilisek lesznek. Az ezek hasítása során nyert fragmentumok elektroforézis során a fajra jellemző mintázatot adnak (57, 62, 113, 120).



1. ábra: Sarjadzó gombák riboszómális RNS génjeinek elhelyezkedése

5. Sarjadzó gombák érzékenységeinek meghatározása

A jelenlegi ajánlás szerint rutin érzékenységi vizsgálatot nem minden izolált gomba esetén kell végezni, mivel a *Candida* fajok érzékenysége a különböző antifungális szerek iránt általában megjósolható (54, 97). A *C. albicans* és a *C. parapsilosis* általában érzékeny az összes antifungális szer iránt, míg a *C. krusei* rezisztenciát mutat az antifungális szerek többsége ellen (54). El kell azonban az érzékenységi vizsgálatot végezni terápiára nem reagáló invazív és nem invazív fertőzések esetén (82). Külön problémát jelentenek a ritka kórokozók által okozott fertőzések, hiszen ezeknek a gombáknak az érzékenysége, ritkább előfordulásuk miatt alig ismert (118). Ezek a ritka, de napjainkban egyre gyakrabban izolálható sarjadzó gombák terápiás problémát jelentenek több szempontból is. Egyrészt a leggyakrabban alkalmazott FLU valamint a „gold” standardnak számító AMB iránt csökkent érzékenységet mutathatnak (81, 118), másrészt a laboratórium által rosszul megválasztott, nem megfelelően validált érzékenységi metodika fals érzékenységi eredmény közléséhez vezethet (97).

Standard mikrodilúciós módszer

A sarjadzó gombák érzékenységeinek *in vitro* diagnosztikájában jelentős előrelépés csupán 1997-ben történt, amikor az addig felhalmozódott ismeretek összegzése után elfogadták a standardizált, meghatározott tápfolyadékot (RPMI-1640) és kezdő csíraszámot (10^3 sejt/ml) használó módszert (NCCLS M-27A) (72, 96). Az inkubálási idő fajtól függően 48 illetve 72 órán keresztül tart. A módszerre égetően szükség volt mivel ugyanazon törzsek különböző centrumokban történő vizsgálata során a MIC értékek között akár 4 nagyságrend eltérések is voltak (97). A módszer makrodilúciós és mirodilúciós (leveshígításos) változata egyaránt rendelkezésre áll. A módszer nagy előnye a pontosság, a jó reprodukálhatóság, amit több összehasonlító vizsgálat is igazolt (72). Azóta 2002-ben elkészült a módszer módosított változata is (M27A-2), amely a metodika pontos leírásán kívül tartalmazza a minőségi kontroll törzsek (*C. krusei* ATCC 6258 és *C. parapsilosis* ATCC 22019) 24 és 48 órás inkubálási idő után elvárható MIC értékeit is (73). A módszer pontosan tartalmazza azokat a módosításokat is, amelyek alternatívái lehetnek a standard metodikának anélkül, hogy fals érzékenységi eredményt kapnánk (nagyobb kezdő inokulum, rövidebb inkubációs idő, stb.) (73).

A dokumentumban csak a FLU, az itraconazol és az 5-FC esetén találunk ajánlást a MIC értéken alapuló érzékenységi kategóriákra. Ezek a határértékek jórészt nyálkahártya candidiázisban szenvedő betegek kezelése során nyert tapasztalatokat tükrözik (96), bár az így nyert adatok jól alkalmazhatónak bizonyultak candidémiás betegek kezelése esetén is. Az érzékenységi kategóriák megállapításánál egy új fogalommal, a dózisfüggő érzékenység (DÉ) kategóriájával találkozhatunk az azol típusú antimikotikumok esetén. A kifejezés azt jelenti, hogy a terápiás siker eléréséhez a kérdéses gyógyszert teljes dózisban kell alkalmazni, ha a gomba a DÉ érzékenységi kategóriába esik (54, 96).

A klinikai gyakorlatba nemrégiben bevezetett CAS esetén jelenleg nem eldöntött, hogy a MIC meghatározás során végpontként a teljes gátlást vagy a részleges gátlást kell alkalmazni (6, 90). Az eddigi irodalmi adatok szerint az 'antibiotikum medium 3' jelzés táptalaj alkalmasabb a MIC meghatározásra az RPMI 1640-el összehasonlítva a jobb növekedés és az élesebb végpontok miatt (6). Jelenleg az irodalmi adatok a 24 órás inkubációs idő után történő MIC meghatározást is szorgalmazzák a hagyományos, 48 órás inkubációs idő mellett (90).

A fonalas gombák *in vitro* érzékenységének meghatározása jelenleg az 1998-ban elfogadott (NCCLS M-38 P), majd a 2002-ben módosított ajánlás alapján történik (M-38A) (97).

Kereskedelmi forgalomban kapható tesztek az in vitro érzékenység meghatározására

Minden pontossága ellenére a standard módszer munkaigényessége illetve relatíve hosszú inkubációs ideje miatt nehezen alkalmazható a rutin diagnosztikai munkában. E hátrányt kiküszöbölendő több, a kereskedelmi forgalomban könnyen beszerezhető panel terjedt el, de a legújabb vizsgálatok szerint csupán néhány mutat jó korrelációt a standard módszerrel (97). Általában elmondható, hogy a *C. albicans* érzékenységét a különféle antifungális szerek iránt az összes módszer jól diagnosztizálja, de a nem-*C. albicans* *Candida* fajok esetén súlyos, a betegek életét veszélyeztető fals érzékenységi eredményeket is kaphatunk (97). Különösen igaz ez a FLU esetén, amelynél 6 különféle módszer összehasonlító vizsgálata során bebizonyosodott, hogy csak az E-teszt és a kolorimetriás elven működő Sensititre Yeast One panel alkalmas a pontos érzékenység meghatározáshoz (70).

A kereskedelmi forgalomban kapható módszerek közül az E-teszt tehát a gyakorlatban is jól bevált alternatíva. Az E-teszt csíkok egy preformált koncentráció gradiens formájában tartalmazzák a kérdéses antifungális szert. A csík körül egy ellipszis alakú gátlási zóna alakul ki. Ahol az ellipszis metszi a csíkot ott lesz a MIC érték. E népszerű módszer egyes szerzők szerint nemcsak kitűnő alternatívája a standard, mikrodilúción alapuló módszernek, hanem AMB esetén annál jobb is, amikor AMB iránt rezisztens klinikai izolátumokat keresünk (74, 85). Az E-teszt szerepe különösen akkor fontos, amikor az érzékenységi eredmény leolvasása még a pontos fajmeghatározás előtt válik szükségessé (klinikus tájékoztatása az adekvát terápia érdekében). Az E-teszt az eddigi adatok alapján a legjobb korrelációt mutatja a standard módszerrel nyert érzékenységi eredményekkel (97).

Európában elterjedtek a break-point (határérték) elven működő panelek is, amelyek egy-egy kritikus (alacsonyabb illetve magasabb) koncentrációt tartalmaznak az antifungális szer megfelelő hígításából. A Fungitest nevű panel segítségével egyidejűleg hatféle antifungális szer iránt tudjuk meghatározni az érzékenységet. A gomba szaporodását az indikátor színének megváltozása jelzi. E módszer esetén a fő probléma az alkalmazott indikátor érzékenysége illetve az esetlegesen helytelenül megválasztott MIC- határérték lehet (17, 121).

6. Minimális fungicid koncentráció meghatározása

Kritikus állapotú betegek esetén (endocarditis, neutropénia) szükség lehet az aktuális MIC értéken kívül a gyógyszer hatásosságát jobban jellemző fungicid hatás ismeretére. A fungicid hatás vizsgálata az idő-ölés (time-kill) görbék valamint az MFC meghatározása által lehetséges (92). A baktériumoknál standard metodika áll rendelkezésre a minimális baktericid koncentráció meghatározására. Hasonló, standardizált módszer jelenleg nem áll rendelkezésre a sarjadzó és fonalas gombák MFC értékének a meghatározására (11, 92). Ennek oka döntően abban keresendő, hogy a különböző szerzők eddig a standard módszerrel meghatározott MIC értékek leolvasása után a mikroplate növekedést nem mutató üregeiből különböző mennyiségeket oltottak ki (1-100 μ l), így ezzel 90, 95, 99 %-s gombapusztlást tudtak csupán detektálni. Mivel a standard módszer esetén a mikroplate-be kerülő inoculum mennyiség csupán 100-500 db között lehet, így nem is lehetett pontosan meghatározni az illető antifungális szer hatásosságát jobban kifejező, legalább 99,9 %-s ölü hatást (11, 92).

Újabban, a Cantón és munkatársai által leírt (11) metodika a nagyobb kezdő inoculum által (10^4 sejt/ml) lehetőséget teremtett arra, hogy legalább 99,9 %-s ölü hatást tudjunk mérni, ha a növekedést nem mutató mikroplate-üregének a teljes tartalmát kioltjuk. Ezt a módszert vérből izolált sarjadzó gombák AMB iránti MFC értékének meghatározása során alkalmazta Cantón és munkacsoportja (11). Így vált ismertté, hogy a *C. parapsilosis* és a *C. dubliniensis* törzsek egy része toleráns az AMB iránt, azaz a MIC értéknél 32-szer nagyobb gyógyszer koncentráció sem pusztítja el a sarjadzó gombát (11). A legutóbbi vizsgálatok alapján az MFC meghatározásával kapott eredmények jó korrelációt mutatnak az idő-ölés görbék által kapott eredményekkel (53, 92). A módszert relatíve könnyű kivitelezhetősége miatt Cantón és munkatársai ajánlják a rutin laboratóriumi diagnosztikában is terápiára nem reagáló invazív candidiázisok esetén az MFC meghatározására (92). Az AMB-n kívül Cantón módszerével egyéb sarjadzó gombák MFC értékét eddig még nem vizsgálták (32, 92).

7. Sarjadzó gombák izolálása a DEOEC Orvosi Mikrobiológiai Intézetében

A DEOEC Orvosi Mikrobiológiai Intézetében 1997-től kezdve történik a pontos, faj szerinti azonosítása a sarjadzó gombáknak. A Sabouraud agaron nőtt gombákat CHROMagar Candida táptalajra oltjuk, majd az ID 32C panel segítségével tovább folytatjuk az azonosítást. A leggyakrabban izolált 5 fajon kívül (*C. albicans*, *C. glabrata*, *Candida tropicalis*, *C. krusei* és a *C. parapsilosis*) kis százalékban egyéb, ritkán előforduló sarjadzó gombát is izoláltunk. Érdekesség, hogy ezek az izolátumok általában immunszuppresszált betegek vizsgálati anyagaiból tenyészttek ki. Az első négy év után az adataink elemzése után kiderült, hogy az izolált sarjadzó gombák abszolút száma megháromszorozódott a vizsgált periódus alatt.

A 4 éves vizsgálati periódus alatt *C. albicans* maradt a leggyakrabban izolálható faj. A második leggyakrabban izolált *Candida* species mindig a *C. glabrata* volt (64, 110). A hemokultúrákból egy-két kivételtől eltekintve gyakorlatilag csak a *C. albicans* volt izolálható. A Fungiteszt-el vagy E-teszt-el meghatározott érzékenységi eredmények az általunk vizsgált 5-féle antifungális szer esetén (AMB, 5-FC, mikonazol, ketokonazol és a FLU) a *C. albicans* bizonyult a legérzékenyebbnek. A *C. glabrata* törzsek a flukonazol, míg a *C. krusei* törzsek az AMB iránt relatíve nagy számban csökkent érzékenységet mutattak (64).

A 2001-2002-es években a napi rutin munka során lettünk figyelmesek arra, hogy egyre gyakrabban izoláljuk a *Candida inconspicua* és a *Candida norvegensis* fajok valamelyikét a különböző vizsgálati anyagokból. Az izolátumok döntő része fekvőbetegektől származott, sokszor intenzív terápiás osztályokon kezelt betegektől. Ugyancsak a 2002 év statisztikájából volt felfedezhető, hogy növekedett a nem *Candida albicans* *Candidák* által okozott candidemiák száma is (64). Ezek az epidemiológiában bekövetkezett változások teljesen egybevágtak a nemzetközi adatokkal (50). A legszembetűnőbb növekedés a *C. inconspicua* és a *C. norvegensis* esetén volt felfedezhető. Mivel az irodalmi adatok alapján e két faj a FLU iránt primer rezisztenciával rendelkezik figyelmünk a két faj felé terelődött.

8. *Candida inconspicua* és a *Candida norvegensis* fajok jellemzése

A *C. inconspicua*t 1952-ben írták le először. A *C. inconspicua* nem képez sem, csíratömlőt, sem pedig pszeudohifát, asszimilálja az N-acetil-glükózamint, a glükózt, a D-glükózamint, a D-L-laktátot, a szukcinátot, a citrátot, a glicerint és az etanolt (34, 68). Az első klinikailag is jelentős megbetegedés leírása Baily és munkatársaitól (3) származik, akik flukonazol kezelést követően izolálták AIDS-ben szenvedő betegek torok és nyelvcső váladékaiból. A betegekből AMB kezelést követően sikerült eradikálni a sarjadzó gombát. Leukémiás betegek közötti nozokomiális átvitelt írtak le D' Antonio és munkatársai 3 beteg esetében, akik közül az egyik betegnél nehezen gyógyuló, máj-lép érintettséggel járó szövődmény is kialakult (1).

A *C. norvegensis*-t, először több mint 60 évvel ezelőtt Norvégiában izolálták három asthma bronchiale-ben szenvedő beteg köpetéből (60). Kórokozó szerepe bizonyított peritonitises, candidemiás és alsó légúti kórfolyamatokban (101). Csíratömlőt nem, de Dalmau-plate-n pseudohyphát képez (101).

A két faj elkülönítése hagyományos módszerekkel nehézséget okoz. Elkülönítésük a következő vizsgálatokon alapszik: cellobióz-asszimiláció és pszeudohifaképzés vizsgálata. Az ID32C panel az eszkulin-hidrolízist használja elkülönítésükre. A *C. norvegensis* asszimilálja a cellobiózt, Dalmau-platen pseudohypha képzésére képes és az eszkulin-hidrolízise is pozitív. Ezen vizsgálatok *C. inconspicua* esetén negatív eredményt adnak (68).

A három FLU iránt csökkent érzékenységet mutató faj (*C. inconspicua*, *C. norvegensis* és a *C. krusei*) hagyományos módszerekkel való elkülönítési nehézségei már korábban molekuláris biológiai módszerek alkalmazásához vezettek (34, 76). Nho és munkatársai a bioMérieux cég gyűjteményéből származó, 10-10 *C. inconspicua*, *C. norvegensis* és a *C. krusei* törzset azonosítottak hagyományos (ID 32C és hifa/pszeudohifa képzés) és molekuláris biológiai módszerek (RFLP és RAPD) alapján (76). Az ITS1 és az ITS4 rDNS régiót PCR-el amplifikálták, majd a kapott terméket egyetlen restriktív enzimmel (HhaI) hasították. A három fajnak az elkülönítése nagy feloldóképességű gélben történő futtatás, majd a kapott termékeknek a szekvenálása után volt lehetséges. Az általuk kapott eredmény összhangban állt az ID 32 C panel által kapott eredményekkel. Feltűnő

volt azonban, hogy a *C. norvegensis* törzsek egyike sem képezett pszeudohifát Dalmauplaten, pedig ez a sajátosság karakterisztikus erre a fajra (76).

A *C. inconspicua* és a *C. norvegensis* FLU iránti érzékenysége az irodalmi adatok alapján vegyes képet mutat (1, 4, 76, 111). Bár a két fajt FLU iránt rezisztensnek tartják, az alkalmazott vizsgálati módszertől függően számos FLU iránt érzékeny törzset is fel lehetett fedezni (4, 90, 91). Hasonlóan, az AMB és az 5-FC iránti érzékenysége a két fajnak, az alkalmazott módszertől függően változott a nemzetközi irodalom szerint (4, 91). A két faj CAS iránti érzékenysége nem ismert.

Célkitűzések

1. Munkánk során fel kívántuk deríteni a rutin diagnosztikában *C. inconspicua*-nak vagy *C. norvegensis*-nek diagnosztizált törzsek pontos, species szerinti eloszlását. Összehasonlítottuk a hagyományos diagnosztikai módszerek pontosságát a referenciamódszernek tekintett riboszómális DNS analízissel.
2. A későbbiekben arra kerestünk választ, hogy az irodalomban gyakran felvetődő, de eddig még nem igazolt csökkent flukonazol (FLU) érzékenység valóban bizonyítható-e a *C. inconspicua* törzsek esetén. Rutin használatra alkalmasabb módszert keresve, összehasonlítottuk a standard módszerrel (NCCLS M27A-2) és annak különböző módosításaival (emelt kezdő csíraszám illetve rövidebb, 24 órás inkubációs idő), valamint az E-teszttel kapott FLU MIC értékeket.
3. Terápiás alternatívát keresve meghatároztuk a törzsek érzékenységét a standard módszer szerint amphotericin B (AMB), 5-fluorocitozin (5-FC) és caspofungin (CAS) iránt. Az izolátumok érzékenységét AMB és CAS esetén E-teszt segítségével is megvizsgáltuk.
4. Célul tűztük ki egy alternatív érzékenység meghatározási módszer, a Fungitest alkalmazását a FLU, az AMB és az 5-FC iránti érzékenység vizsgálatára. A módszer pontosságának vizsgálata érdekében az eredményeket a standard módszerrel kapott érzékenységi kategóriákkal hasonlítottuk össze.
5. További adatokat gyűjtöttünk az AMB, az 5FC és a CAS klinikai hatásosságáról a minimális fungicid koncentráció meghatározásával.
6. Célunk volt egy a CAS érzékenység vizsgálatára alkalmas mikrodilúciós módszer kidolgozása a MFC értékek alapján, összehasonlítva a különböző inkubációs idők és végpont meghatározási kritériumok alkalmazásával kapott MIC értékeket és azok korrelációját a MFC értékekkel.

Anyagok és módszerek

Sarjadzó gombák izolálása betegekből

A vizsgált időszak a 2001. január. 1. és a 2003. december. 31. közötti időszakot foglalta magában. Az ID 32C panel segítségével *C. inconspicua* vagy *C. norvegensis* fajoknak azonosított sarjadzó gombák közül 48, különböző betegtől származó izolátumot használtunk az érzékenység meghatározás során. A sarjadzó gombák faj szerinti elkülönítő vizsgálata során 22 betegtől származó, 29 klinikai izolátumot használtunk. A 42 fekvő beteg közül 22 volt immunkompromittált és klinikánk 10 különböző osztályain álltak kezelés alatt. Tizenöt beteg intenzív terápiás osztályon feküdt. Tizenegy beteg kapott előzetesen flukonazol kezelést de, AMB-t vagy 5-FC-t egyik beteg sem. A vizsgálati anyagok között az alsó (24 izolátum) és a felső (16 izolátum) légutakból származók voltak a leggyakoribbak, de steril testtájokról is (vér, hasüreg) izoláltuk a két faj valamelyikét.

Sarjadzó gombák azonosítása hagyományos módszerekkel.

A Sabouraud-agaron nőtt tenyészeteket először főtális borjúszerumban inkubáltuk 2 órán keresztül, csíratömlő képzés detektálása céljából. Ezzel párhuzamosan elvégeztük a CHROMagar Candida táptalajra történő leoltást is a fajok elkülönítése és a tenyészet tisztaságának ellenőrzése miatt. A további azonosítás, hasonlóan a korábbi, rutin diagnosztikai munkához, az ID 32C panel segítségével történt, 48 órás inkubáció után. Az izolátumok hifa és pszeudohifa képzését rizsagaron vizsgáltuk (Dalmau-plate) (79). A rizsagar felszínére oltott sarjadzó gombát steril fedőlemezzel lefedve 14 napig inkubáltuk. Fénymikroszkóppal naponta minden törzset megtekintettünk.

Sarjadzó gombák azonosítása molekuláris biológiai módszer alapján

A DNS-izolálását Hoffman és Winston módszerével végeztük (44). A rDNS-nek kb. 1900 bp-nyi szakaszának amplifikációja az NS3 (5' GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC 3') és az ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) primerek segítségével történt. Az amplifikált szakasz magában foglalja a rDNS 18S alegységének egy szakaszát, az 5,8S alegységet, a két ITS szakaszt és a nagy rDNS egy kis darabját (1. ábra). A PCR 30 µl reakcióelegyben zajlott, mely 3 µl 10x PCR-puffert, 1,5 µl

50 mM MgCl₂-t, 0.1 µl 25 mM deoxynucleoside triphosphat keveréket, 1.6 U DyNAzyme II DNS-polymerase-t (Finnzymes), 1µl NS3-primert, 1µl ITS4-primert és 4 µl templátot tartalmazott. A PCR-amplifikálás (Sprint Thermal Cycler, Hybaid Ltd, England) a következő paraméterek alapján történt: 5 perc 95°C, a következő 35 cikluson keresztül: 30 sec 95 °C, 30 sec 61, 5 °C, 3 perc 72°C, végső lánchosszabbítás: 7 perc 72°C. Az amplifikált termékeket MspI, RsaI, ScrFI és HaeIII (New England Biolabs) restriktációs enzimekkel hasítottuk. A restriktációs emésztést 11µl (1µl enzimpuffer, 3 U restriktációs enzim, 3 µl amplifikált rDNS) végtérfigattal hajtottuk végre. Négy órás, 37°C-on történő inkubálás után a kapott fragmentumokat hagyományos gélelektroforézissel szeparáltuk, 1,5%-os etídium-bromidot tartalmazó gélben (120V, 2 óra). A ribotipizálással kapott gélmintázatok kiértékelése számítógépes program segítségével (Molecular Analyst Program, BioRad) történt.

A ribotipizáláshoz a *C. krusei* ATCC 6258, a *C. inconspicua* 16783 ATCC és a *C. norvegensis* ATCC 22977 számú törzset használtuk referencia törzsként.

Érzékenység meghatározása mikrodilúciós módszer szerint

A mikrodilúciós módszert szigorúan a standard mikrodilúciós módszer (NCCLS M27-A2) ajánlását követve végeztük el (72, 73).

A FLU (Pfizer), az 5-FC (Sigma) és a CAS (Merck Researc Laboratories) szubsztanciákat steril desztillált vízben, míg az AMB-t (Sigma) 100 % dimetil szulfoxidban oldottuk fel. Az antifungális szerek koncentrációi a következők voltak: flukonazol: 0,25-128 µg/ml, 5-FC: 0,12-64 µg/ml, AMB és CAS: 0,015-8 µg/ml. Felhasználásig –70°C-n tároltuk a plate-eket.

A sarjadzó gombák 20-24 órás, Sabouraud-agaron nőtt friss tenyészetéből 0,5 McFarland Standard (spektrofotométerrel, 540 nm-en) sűrűségű szuszpenziót készítettünk. A kívánt csíraszám (10³, 10⁴ vagy 10⁵ sejt/ml) beállításához a hígításokat RPMI 1640-ben oldattal végeztük. Minden alkalommal sarjadzó gombát illetve antifungális szert nem tartalmazó kontrollokat is beállítottunk. Az inkubálás 35 C⁰-n történt. Az érzékenységi eredmények vizuális leolvasását 24 és 48 óra után egyaránt elvégeztük. Amphotericin B, 5-FC és FLU esetén referencia eredménynek a 48 órás inkubálási idő után kapott MIC értékeket vettük. Caspofungin esetén a referencia MIC a 24 óra utáni, részleges gátlás MIC eredménye volt (90).

Érzékenység meghatározása E-teszt segítségével

A Sabaraud-agaron nőtt 20-24 órás telepekből fiziológias sóoldatban 0,5 McFarland sűrűségű szuszpenziót készítettünk. Az érzékenység meghatározásához 2% glükózzal kiegészített RPMI-1640 agart használtunk. Az inkubálást 35 C⁰-on végeztük. A MIC értékeket 24 és 48 óra múlva is meghatároztuk.

Érzékenység meghatározása Fungitest segítségével

A Fungitest (Bio-Rad SDP) panel inokulációját a gyártó ajánlásának megfelelően kb. 1×10^3 sejt/ml-es sűrűségű szuszpenzióval végeztük. Cellux-al lefedve 48 óráig inkubáltuk 35 C⁰-n. A gombák szaporodását az indikátor színének a megváltozása jelezte (kékből rózsaszínbe átcsapás).

Minimális fungicid koncentráció meghatározása

Az MFC meghatározását a Cantón és munkatársai által leírtak szerint végeztük (11). Az AMB-t, az 5-FC-t és a CAS-t tartalmazó plate-ek elkészítése az NCCLS M27-A2 ajánlása alapján történt. Az inokulum mennyisége AMB és 5FC esetén hozzávetőleg 10^4 CFU/ml volt, amit kvantitatív kioltással ellenőriztünk. Az inkubálás 48 óráig, 35 C⁰-n történt. A 48 órás MIC meghatározás után a mikroplate teljesen tiszta üregeinek a tartalmát pipettával összeszuszpendáltuk és a teljes mennyiséget 2 db Sabouraud-agarra kioltottuk (100-100 μ l). A szuszpenziót hagytuk megszáradni, majd steril kaccsal a Sabouraud-agar felületére kihúztuk a kioltott sarjadzó gomba sejteket. A Sabouraud-agar plate-k inkubálása 48 órán át, 35 C⁰-n történt.

CAS esetén a Chryssanthou és Cuenca-Estrella által (16) a sarjadzó gombáknak a vorikonazol és a CAS iránti MIC meghatározására alkalmazott 10^5 CFU/ml kezdő csíraszámát használtuk. További módosítás volt, hogy a mikroplate üregeinek a teljes tartalmát már az első részleges gátlást mutató üregtől kezdve kioltottuk. A kioltást 24 és 48 órás inkubációs idő után is elvégeztük.

Eredmények interpretálása

Az érzékenységi vizsgálatok esetén a *C. krusei* ATCC 6258 és *C. parapsilosis* ATCC 22019 törzsei szerepeltek minőségi kontrollként.

FLU iránt érzékenynek (É) tekintettük azt a törzset, amelynek MIC értéke ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$, DÉ-nek ha a MIC 16-32 $\mu\text{g/ml}$, és rezisztensnek (R)-nek ha a MIC ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ volt (73). 5-FC esetén É volt a törzs, ha a MIC ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$, mérsékelten érzékeny, (MÉ) ha a MIC 8-16 $\mu\text{g/ml}$ és R, ha a MIC érték ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ volt (73).

AMB esetén a jelenleg legjobban elfogadott, <1 $\mu\text{g/ml}$ MIC értékhatárt alkalmaztuk a rezisztencia határértékének (87). A CAS MIC meghatározáshoz a Stone által javasolt ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ -s érzékenységi határt alkalmaztuk (109).

A különböző módszerekkel kapott MIC értékeket a standard módszerrel (normál inokulum, 48 órás inkubálási idő) kapott MIC értékekhez hasonlítottuk. Az átlagos egyezés számítása: a kapott MIC érték ± 1 hígítási fokban azonos eredményt adott a standard módszerrel kapott MIC értékkel. Hasonlóan, az érzékenységi kategóriák egyezését úgy számoltuk, hogy az adott módszerrel kapott érzékenységi kategóriát hasonlítottuk a standard módszerrel kapott érzékenységi kategória eredményéhez.

Az MFC-nek a gyógyszernek azt a koncentrációját tekintettük, ahol a sarjadzó gombáknak legalább 99,9 %-ka elpusztult.

Eredmények és következtetések

1. Klinikai izolátumok azonosítása

(I. dolgozat)

Csírátömlőt egyetlen tesztözs és klinikai izolátum sem képezett. Az ID 32C panel segítségével elvégzett vizsgálatok alapján 27 izolátumot az ATB automata *C. inconspicua*/*C. norvegensis* (biokód: 0200010005), míg 2 másik izolátumot *C. inconspicua*/*C. norvegensis*/*C. krusei* fajoknak azonosította (biokód: 0200010001) jó, illetve elfogadható eredménnyel (good and acceptable identification) (I. dolgozat, 1. táblázat). A három faj pontos elkülönítésére az eszkulin hidrolízist javasolja a gyártó (BioMérieux). Mivel a 29 izolátumból 28 db hidrolizálta az eszkulint, ezért ezt a 28 törzset *C. norvegensis*-ként azonosítottuk az ID 32C panel segítségével.

Dalmau-plate-n a 29 klinikai izolátum közül csak 1 esetben észleltük, hogy a törzs pszeudohifát képez. Ugyanez a törzs hidrolizálta az eszkulint is. A tesztörzsek közül csupán a *C. krusei* ATCC 6258-s számú törzse képezett pszeudohifát, az irodalmi adatoknak megfelelően (59). Az elvárásokkal ellentétben a *C. norvegensis* ATCC 22977 számú törzse sem képezett pszeudohifát a 14 napos inkubációs idő alatt (60). Nho és munkatársai (76) hasonló eredményt kaptak a BioMérieux törzsgyűjteményéből származó izolátumok esetén, azaz a *C. norvegensis* törzsek nem képeztek pszeudohifát Dalmau-plate-n. Saját anyagunk esetén 28 törzsünket a pszeudohifa képzés alapján *C. inconspicua*-nak azonosítottuk.

A négyféle restriktív enzimmel történő hasítás majd a kapott fragmentumok elektroforézise után a 3 ATCC tesztörzs esetén három, jól elkülöníthető mintázatot kaptunk (I. dolgozat, 1. ábra). A klinikai izolátumok mindegyike esetén a kapott mintázat a *C. inconspicua* ATCC 16783-s törzsére jellemző mintázattal egyezett meg. Eredményünk alapján tehát az eszkulint hidrolizáló, de pszeudohifát nem képező összes izolátumunk *C. inconspicua*-nak bizonyult. Az általunk kapott eredmények megerősítik, hogy a biokémiai reakciók és a morfológiai vizsgálatok nem mindig elegendőek a pontos fajszerű azonosításhoz a *C. inconspicua* és a *C. norvegensis* esetén (79). Nho és munkatársai a mienkhez hasonló problémával találkoztak a BioMérieux cég által a rendelkezésükre bocsátott *C. inconspicua* és *C. norvegensis* törzsek esetén (76). Módszerünkkel (egyetlen

restrikciós enzim) csupán a kapott restrikciós fragmentumok a szekvenálása által lehetett a két fajt pontosan elkülöníteni, mivel a kapott fragmentumoknak a mérete a két faj esetén nagyon közel állt egymáshoz. Munkájuk során referencia törzsként nem ATCC tesztörzset használtak a *C. inconspicua* esetén. Saját módszerünkkel, az amplifikált rDNS hasítása majd, a kapott mintázat alapján szekvenálás nélkül pontosan el tudtuk különíteni egymástól a két fajt.

2. Flukonazol iránti érzékenység meghatározása

(I. és II. dolgozat)

A mikrodilúciós módszer alapján kapott eredményeink azt mutatják, hogy a törzsek túlnyomó többsége DÉ-et mutat a FLU iránt, függetlenül az alkalmazott csíraszámától és a leolvasási időtől (1. táblázat illetve II. dolgozat, 1. táblázat). A referencia módszerrel kapott eredmények alapján nem találtunk É törzset ($MIC_{90}=32\mu\text{g/ml}$). Bár a nemzetközi irodalomban az eddig ismert érzékenységi adatok alapján kevés számú érzékeny törzset is találunk (4, 91), a *C. inconspicua* FLU iránti *in vitro* csökkent érzékenysége saját vizsgálatunk alapján megerősítést nyert. A normál és az emelt csíraszámú inokulummal 24 órás inkubálás után 3 illetve 1 esetben É izolátumot is detektáltunk. A standard módszerrel R-nek bizonyult 5 izolátum közül, a normál és az emelt inokulummal végzett 24 órás leolvasás esetén 3 illetve 2 törzs a DÉ kategóriába került. Figyelemre méltó, hogy az átlagos egyezés a módosított mikrodilúciós módszerek és a standard metodika között ± 1 hígítási fokban kiváló volt (93,7-100 %), hasonlóan az irodalmi adatokhoz (73, 75). Azonos érzékenységi kategóriát 66,7-89,5 %-ban diagnosztizáltunk. Az érzékenységi kategória változás döntő részben a DÉ törzseknek a R kategóriába kerülése miatt következett be. A legrosszabb érzékenységi kategóriaegyezés az emelt csíraszámú, 48 órás inkubációs idő után volt megfigyelhető bár ez a módszer az összes R törzset pontosan detektálta. Eredményünk alapján 24 órás (normál és emelt inokulum) inkubációs idő után fennáll a lehetősége a R törzsnek DÉ törzsként történő félre diagnosztizálásának, így a rövidebb inkubációs időt használó mikrodilúciós módszerek nem helyettesíthetik a standard módszert *C. inconspicua* esetén.

A klinikai izolátumok FLU iránti érzékenységét E-teszt-el vizsgálva szembetűnő, hogy a törzsek alig fele tartozott a DÉ kategóriába, nagymértékben növekedett azonban a R izolátumok száma (1. táblázat illetve 2. dolgozat, 1. táblázat). A 24 órás eredmények esetén 3 esetben tapasztaltunk fals pozitív érzékenységet. A MIC értékek különösen a 48 órás inkubálás után emelkedtek meg ($MIC_{50/90}=64/128\mu\text{g/ml}$). Az E-teszttel kapott eredmények tévesen magas MIC értékei miatt nagyszámú, fals R törzset detektáltunk. Leolvasási időtől függetlenül, a standard módszerrel R-nek bizonyult törzseket azonban pontosan detektálta a módszer. Ennek terápiás jelentősége van, hiszen a betegek kezelése során elkerülhetjük a biztosan hatástalan szerrel való terápiát. Megjegyzést érdemel, hogy E-teszttel kapott

tévesen alacsony MIC értékekre is van példa az irodalomban (89). A *C. glabrata* törzsek egy részének a FLU iránti MIC értékei, diagnosztikai problémát okozva az É illetve a DÉ kategória felső részében helyezkednek. Az ilyen törzsek pontos MIC értékét az E-teszt sokszor nem képes pontosan detektálni, így az eredetileg DÉ törzset tévesen É-nek illetve a R törzset DÉ-nek diagnosztizálhatjuk (89). Esetünkben, bár a fals rezisztens izolátumok száma magas volt, az E-teszt jó választásnak tűnik a FLU rezisztens klinikai izolátumok keresésére (screening), de nem a pontos MIC meghatározásra. A pontos fajszintű meghatározás természetesen nélkülözhetetlen.

A Fungitest-el kapott eredmények öt É és egy R izolátum mellett a törzsek túlnyomó részét DÉ-nek mutatták (87,4 %) (1. táblázat). Az érzékenységi-kategória egyezés nagyon jó volt a standard módszerrel összevetve (81,1%) de 5 DÉ törzset É-nek illetve az 5 R törzs közül 4-t DÉ-nek mutatta a módszer. Swoboda-Kopec és munkatársai (111) akik 15 májtranszplantáción átesett betegről származó *C. inconspicua* klinikai izolátum érzékenységét vizsgálták Fungitest segítségével, a mi eredményünkhöz hasonlóan a törzsek döntő részét (93 %) DÉ-nek találták. Sajnos ők nem végezték el a standard módszer szerint a flukonazol iránti érzékenység meghatározást. Helyénvalónak látszik, Davey és munkatársainak a (17) megállapítása, hogy a Fungitest panel nagy hátránya, hogy a rezisztens klinikai izolátumokat kis hatékonysággal képes detektálni. A Fungitest-el kapott eredményeknek esetünkben súlyos terápiás következménye lehet, mivel R izolátummal történő fertőzés esetén a törzs a DÉ kategóriába kerülhet, amikor még az emelt dózissal (800-1000 mg/nap) történő kezelés is biztosan hatástalan.

1. táblázat: Kategóriák szerinti egyezések és eltérések a standard módszerhez (NCCLS M27-A2) képest.

módszer	inokulum/ inkubációs idő	Egyezés ^a	MIC _{50/90}	izolátumok kategóriák szerint (%) ^b			eltérések (%)			egyezés kategóriák szerint ^c
				S	S-DD	R	S-DD vs S	S-DD vs R	R vs S-DD	
NCCLS M27-A2	10 ³ CFU/ml 48h		32/32	0	89,5	10,5				
LHM ^d	10 ³ CFU/ml 24h	100%	32/32	6,3	89,5	4,2	6,3	0	6,3	87,4%
LHM ^d	10 ⁴ CFU/ml 24h	100%	32/32	2,1	87,4	4,2	2,1	4,2	4,2	89,5%
LHM ^d	10 ⁴ CFU/ml 48h	93,7%	32/64	0	58,3	41,7	0	33,3	0	66,7%
Eteszt	24h	97,9%	32/64	6,3	56,2	37,5	6,3	29,1	0	64,6%
Eteszt	48h	58,3%	64/128	0	14,6	85,4	0	75	0	25%
Fungitest	48h			10,5	87,4	2,1	10,5	0	8,4	81,1%

^a % egyezés megmutatja, hogy ± egy hígításon belül mennyi MIC érték egyezett a standard módszerrel (NCCLS M27-A2)

^b A különböző kategóriákba sorolt izolátumok az összes százalékában

^c Azon izolátumok százaléka, amelyek kategória szerinti besorolása egyezett a standard módszerrel kapott besorolással

^d leveshígítási módszer

3. Amphotericin B in vitro aktivitása *C. inconspicua* izolátumok ellen

(III. dolgozat)

A standard módszerrel nyert 48 órás MIC értékek (2. táblázat illetve III. dolgozat, 1. táblázat) szűk határok között voltak (0,25-1 µg/ml). A törzsek többsége (27/48, 56,3 %) R-nek bizonyult AMB iránt. Huszonnégy órás inkubációs idő után a MIC értékek 1 hígítási fokkal alacsonyabbnak bizonyultak ($MIC_{90}=0,5$ µg/ml) és így minden törzs az É kategóriába került. Az standard módszerrel kapott MIC értékeink 3 hígítási fokkal magasabbak voltak a Barchiesi és munkatársai (4) által kapott MIC értékeknél ($MIC_{90}=0,125$ µg/ml). A különbség valószínűleg földrajzi okokban keresendő.

A törzsek érzékenységét E-teszttel vizsgálva a kapott eredmények átlagosan 2 (24 órás inkubáció után) illetve 1 (48 órás inkubáció után) hígítási fokkal voltak alacsonyabbak a standard módszerrel kapott MIC eredményeknél ($MIC_{90}=0,5$ µg/ml, mindkét esetben). A legjobb átlagos egyezést 48 órás leolvasás után figyelhettük meg (2. táblázat illetve III. dolgozat 1. táblázata)

Az E-teszttel kapott kategória-egyezés rossz volt a standard módszerrel összehasonlítva, mind 24 óra (41,7 %) mind, pedig 48 óra (45,8 %) inkubációs idő után. Adataink azt jelzik, hogy az AMB-re csökkent érzékenységet mutató törzsek keresésére (screening) ajánlott E-teszt metodika használhatósága (15), legalábbis *C. inconspicua* esetén korlátozott.

2. táblázat. Amphotericin B (AMB) MIC és MFC értékek a vizsgált izolátumok esetén.

	AMB MIC/MFC ($\mu\text{g/ml}$) eloszlás							egyezés ¹
	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	MIC _{50/90}	
LHM ² 48 h	0	0	3	18	27	0	1/1	-
LHM ² 24 h	0	1	19	28	0	0	0.5/0.5	89.5
E-teszt 24 h	1	23	18	4	2	0	0.12/0.5	76.9
E-teszt 48 h	0	1	16	26	5	0	0.5/0.5	87.5
MFC	0	0	0	0	3	45	2/2 ³	--

¹ % egyezés megmutatja, hogy \pm egy hígításon belül mennyi MIC érték egyezett a standard módszerrel (NCCLS M27-A2)

² leveshígítási módszer

³ MFC_{50/90}

Fungitest-et használva minden törzs É-nek bizonyult AMB iránt, hasonlóan Swoboda-Kopec és munkatársainak (111) az eredményeihez. Eredményünk azt mutatja, hogy az összes (27 izolátum) R törzsünket érzékenynek mutatta a Fungitest. A Fungitest-ben szereplő mindkét határérték (2 ill. 8 $\mu\text{g/ml}$) magasabb a legelfogadottabb 0,5 $\mu\text{g/ml}$ -s rezisztencia határértéknél (15, 54, 82). A magasabb határérték miatt a Fungitest nem képes biztonságosan detektálni a R illetve a R határán lévő törzseket, így alkalmazása a rutin diagnosztikában nem biztonságos a beteg szempontjából AMB esetén.

4. Az 5-fluorocitozin iránti érzékenység meghatározása

(III. dolgozat)

A standard módszer szerint (3. táblázat illetve III. dolgozat, 1. táblázat) minden izolátum érzékenynek bizonyult ($MIC_{90}=2 \mu\text{g/ml}$), jelezve, hogy a *C. inconspicua* törzsek nem rendelkeznek primer rezisztenciával az 5-FC iránt. Eredményeink hasonlóak a Barchiesi és munkatársai (5) által kapott adatokhoz, akik 15 db *C. inconspicua* törzs esetén 13 izolátumot É-nek, míg 2 izolátumot MÉ-nek találtak 5FC iránt, bár az ő tanulmányuk esetén nem lehet tudni, hogy előzetesen 5-FC kezelés történt-e.

A *C. inconspicua* izolátumok érzékenységét Fungitest-el vizsgálva a 48 izolátumból csak 7 bizonyult É-nek, a többi a MÉ kategóriába tartozott (3. táblázat illetve III. dolgozat, 1. táblázat). A standard módszerrel való egyezés csupán 14,4 %-s volt. Eredményünk hasonló a Swoboda-Kopec és munkatársai (111) által kapott eredményekhez, akik az általuk vizsgált 15 db klinikai izolátum mindegyikét MÉ-nek találták 5-FC iránt.

Adataink jól jelzik, hogy helytelenül megválasztott MIC határérték ($2 \mu\text{g/ml}$ a $4 \mu\text{g/ml}$ helyett), esetén a fals érzékenységi eredmények száma növekszik. 5-FC esetén a kapott fals érzékenységi eredménynek a betegek kezelését károsan befolyásoló hatása nincs, bár az 5-FC így kimaradhat az AMB-vel vagy egyéb antifungális szerrel történő kombinációs kezelésből.

3. táblázat. Az 5-fluorocytosine (5-FC) MIC és MFC értékek a vizsgált izolátumok esetén.

	5-FC MIC vagy MFC ($\mu\text{g/ml}$) eloszlás										MIC _{50/90}
	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	
LHM ¹ 48 h	0	0	0	19	29	0	0	0	0	0	2/2
LHM ¹ 24 h	1	3	16	27	1	0	0	0	0	0	1/1
MFC	0	0	0	0	0	2	3	8	17	18	32/64 ²

¹ Leveshígítási módszer

² MFC_{50/90}

5. Caspofungin iránti érzékenység meghatározása

(IV. dolgozat)

A 4. táblázat illetve a IV. dolgozat 1. táblázatának adataiból látható, hogy a CAS kiváló *in vitro* aktivitást mutatott a *C. inconspicua* törzsek függetlenül a leolvasási időtől és a MIC végponttól (részleges vagy teljes gátlás). Ha a teljes gátlást választottuk végpontnak, a MIC értékek átlagosan 2 hígítási fokkal emelkedtek. Eredményünk egyezik az irodalmi adatokkal, amely alapján, ha a totális gátlást választjuk a MIC végpontjának, akkor 1-2 hígítási fokkal magasabb lesz a kapott MIC érték a részleges gátlással kapott MIC értékhez képest (90).

Az E-teszt eredmények leolvasása nagyon könnyű volt, hiszen apró telepek (mikrokolóniák) az ellipszis alakú gátlási zónán belül soha nem voltak észrevehetőek. Az E-teszttel kapott MIC értékek 24 és 48 óra utáni leolvasás után hasonlóak voltak a részleges gátlást mutató, 24 órás inkubációs idő után kapott MIC értékekhez (mindkét esetben a MIC_{50/90} értékek: 0,25 µg/ml voltak). Az E-teszttel kapott MIC eredményeket összehasonlítva a standard módszerrel nyert MIC értékekkel (\pm egy hígítási fokon belül) jó egyezést csak a 24 órás, részleges gátlási végponttal nyert leolvasással kaptunk (87,5 %). Sarjadzó gombák CAS iránti MIC értékeinek összehasonlító vizsgálatát a standard módszer és E-teszt egyidejű alkalmazásával eddig két esetben végezték el. Jó egyezést a két módszer között csupán a kevésbé szigorú, \pm két hígítási léptékű egyezés esetén kaptak a szerzők (16, 61). Mindkét esetben a MIC értékeket 48 órás, teljes gátlást mutató végpont alkalmazásával nyerték.

4. táblázat. Caspofungin (CAS) MIC és MFC ($\mu\text{g/ml}$) értékek eloszlása a vizsgált izolátumok esetén.

	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	MIC _{50/90}	egyezés ¹
LHM _{PI} 24 h	4	27	17	0	0	0	0.12/0.25	
LHM _{PI} 48 h	0	13	31	4	0	0	0.25/0.25	81.1
LHM _{TI} 24 h	0	0	2	19	27	0	1/1	16.7
LHM _{TI} 48 h	0	0	1	19	26	2	1/1	14.6
E-test 24 h	0	8	35	5	0	0	0.25/0.25	87.5
E-test 48 h	0	3	24	21	0	0	0.25/0.5	62.5
MFC 24 h	0	10	28	8	2	0	0.25/0.5 ³	
MFC 48 h	0	31	17	0	0	0	0.12/0.25 ³	

¹ % egyezés megmutatja, hogy \pm egy hígításon belül mennyi MIC érték egyezett a standard módszerrel (NCCLS M27-A2)

² leveshígítási módszer

³ MFC_{50/90}

6. Minimális fungicid koncentráció meghatározása

(III. és IV. dolgozat)

AMB esetén (2. és 5. táblázat illetve III. dolgozat, 1. táblázat) kitűnik, hogy a törzsek többségének az MFC értéke 2x illetve 4x volt nagyobb az aktuális MIC értéknél. Eredményünk alapján az AMB iránti tolerancia (MFC \geq 32 x MIC) nem jellemző a *C. inconspicua* törzsekre. Figyelemre méltó, hogy a vérben elérhető 2 μ g/ml csúcskoncentráció értéket (116) soha nem haladták meg a MFC értékek. Ez azt jelenti, hogy a napi 1mg/kg dózissal történő AMB kezelés során a szérumban elérhetjük a kórokozó eradikálásához szükséges koncentráció értéket, azaz az AMB alkalmas a *C. inconspicua* okozta invazív fertőzések kezelésére az *in vitro* eredmények alapján. Ezzel szemben Nguyen és munkatársai (74) azt találták, hogy nagyobb valószínűséggel várható terápiás sikertelenség, ha a 48 órás inkubáció után kapott MFC értékek meghaladják az 1 μ g/ml-es értéket. Eredményeink illetve a Nguyen és munkatársai (74) által kapott eredmények alapján további vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy az AMB alkalmas-e a *C. inconspicua* által okozott fertőzések kezelésére.

5-FC esetén (3. és 5. táblázat illetve III. dolgozat, 1. táblázat) az MFC értékek széles határok között mozogtak (MFC=1-32 x MIC). Eredményeink alapján a törzsek 50 %-a toleránsnak bizonyult az 5-FC iránt, jelezve, hogy az 5-FC inkább fungisztatikus mint fungicid hatású antifungális szer *C. inconspicua* ellen. Eredményünk megerősíti Ernst és munkatársainak a korábbi megállapítását, akik a terápiás problémát okozó *C. lusitaniae* törzsek ellen vizsgálták az 5-FC hatását, az idő-ölés görbék segítségével (33). Fungicid hatást a vizsgált 11 db *C. lusitaniae* törzs esetén csak 2 esetben tapasztaltak. A *C. inconspicua* törzseknek az 5-FC iránti toleranciájának a klinikai jelentősége nem ismert. *In vitro* adataink alapján a MFC értékek nem érik el a vérben még biztonságosan elérhető 100 μ g/ml-es értéket, ezért az 5-FC-nak szerepe lehet a *C. inconspicua* fertőzések kezelésében. Mivel monoterápia esetén az addig érzékeny izolátum könnyen rezisztenssé válhat a kezelés folyamán, ezért az 5-FC csupán kombinációs terápia részeként ajánlható *C. inconspicua* fertőzések kezelésére (9, 54, 82, 84, 114).

CAS esetén a kapott MFC értékek 24 órás inkubációs idő után 0,12-1 míg 48 órás inkubációs idő után 0,12-0,25 μ g/ml határok között helyezkedtek el (4. és 5. táblázat

illetve IV. dolgozat 1. táblázata). Figyelemre méltó, hogy az MFC értékek soha nem haladták meg a MIC értékek négyszeresét. Negyvennyolc órás inkubációs idő után a 48 izolátum közül 43 esetben (87,5 %) az MFC értékek a MIC értékekkel egyeztek meg. Ha a 24 órás inkubációs idő utáni kioltással kapott MFC értékeket a 48 órás, teljes gátlással kapott MIC értékekhez hasonlítjuk (± 1 hígítási fokon belül), akkor csak 45,8 %-s egyezést kapunk. Az MFC értékek a 24 és a 48 órás inkubációs idő utáni kioltások után csak 2 esetben érték el a 48 órás, teljes gátlási végpontként kapott MIC értéket. Ezek az adatok azt jelzik, hogy a teljes és a részleges gátlási végpontokkal kapott MIC értékek közötti különbségek jórészt elpusztult sarjadzó gombasejtek következtében jönnek létre.

Klepser és munkatársai (52) egy másik echinocandinnal, az anidulafunginnal (LY303366) végzett kísérletek során a sarjadzó gombasejteket a MIC₈₀-ál nagyobb anidulafungin koncentráció mellett tenyésztették. Scanning elektronmikroszkóppal megvizsgálva a gombasejteket jelentős strukturális abnormalitásokat fedeztek fel az életképesség jelei nélkül. Mi magunk a Klepser és munkatársai által leírtakat felhasználva, transzmissziós elektronmikroszkóp alkalmazásával erősítettük meg, hogy a tévesen magas MIC értékekért *C. inconspicua* esetén, (totális gátlási végpont) az elpusztult gombasejtek és a sejttermelék a felelős. Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy a 24 órás, részleges gátlási végpontot helyesebb alkalmazni a MIC érték leolvasása során. A többi, klinikailag jelentős sarjadzó gombák esetén további vizsgálatok szükségesek a MIC és az MFC értékek közötti összefüggések megismerésére.

5. Táblázat. A MIC és MFC értékek korrelációja amphotericin B (AMB), 5-fluorocytosine (5FC) és a caspofungin (CAS) esetén

	A MIC-nél n-szer magasabb MFC-vel jellemzett izolátumok száma					
	1xMIC	2xMIC	4xMIC	8xMIC	16xMIC	32xMIC
AMB	2	25	19	2	0	0
5-FC	0	2	3	5	14	24
CAS 24h	17	25	6	0	0	0
CAS 48h	43	5	0	0	0	0

Az eredmények összefoglalása

1. A hagyományos diagnosztikai módszerek nem bizonyultak elegendőnek a *C. inconspicua* és a *C. norvegensis* klinikai izolátumok biztonságos elkülönítésére. Az általunk alkalmazott módszer, a rDNS PCR-el történő amplifikálása, majd a kapott DNS-daraboknak restrikciós enzimmel történő hasítása segítségével a két faj gyorsan és biztonságosan elkülöníthető egymástól.
2. *In vitro* eredményeink alapján a *C. inconspicua* flukonazol (FLU) iránti csökkent érzékenysége bizonyított, így terápiás alkalmazása ellenjavallt.
3. A *C. inconspicua* törzsek amphotericin B (AMB) iránti minimális gátlási koncentráció (MIC) és minimális fungicid koncentráció (MFC) értékei megközelítik, illetve meghaladják a klinikailag még hatásosnak elfogadott határértéket, így az AMB monoterápia alkalmazása a *C. inconspicua* fertőzések kezelésében kérdéses.
4. 5-fluorocitozin iránt minden izolátum érzékenynek bizonyult a standard módszer alapján, de a törzsek többsége toleranciát mutatott.
5. A caspofungin (CAS) a MFC értékek alapján kitűnő fungicid hatású szernek bizonyult. A standard mikrodilúciós módszer esetén a MIC értékek leolvasásánál a 24 órás, részleges gátlási végpont kritérium alkalmazása javasolt.
6. Az alternatív érzékenység meghatározási módszerek közül csupán a CAS E-teszt alkalmas az érzékenység pontos meghatározására. Bár a FLU E-teszttel a standard módszerrel kapott MIC értékeknél általában fals magasabb értékeket kapunk, segítségével a rezisztens klinikai izolátumot még a pontos fajmeghatározás eredménye előtt fel lehet ismerni, megelőzve a terápiás sikertelenséget.

Köszönetnyilvánítás

Megköszönöm témavezetőmnek, Szabó Béla főiskolai docensnek, hogy felkeltette az érdeklődésemet a sarjadzó gombák iránt, és tanácsaival segítette, hogy kutatási terveink megvalósulhattak.

Külön köszönöm Pappné Falusi Erzsébetnek, hogy a laboratóriumi munkában mindig segítségemre volt és ötleteivel valamint lelkiismeretes munkájával az adódó nehézségeken mindig átsegített.

Köszönet illeti, Maráz Anna Professzor Asszonyt, amiért Intézetében lehetőséget teremtett a molekuláris biológiai vizsgálatok elvégzésére.

Köszönöm Simonné Miszti Ceciliának, Andirkó Istvánnak, Kardos Gábornak, Bánk Józsefnek és Hartmann Zsoltnak valamint az Orvosi Mikrobiológiai Intézet minden munkatársának, hogy munkájukkal lehetővé tették, hogy a kutatásokra megfelelő mennyiségű időt szakíthattam.

Köszönöm az utóbbi 3 év TDK-s hallgatóinak (Szabó Anikó, Katona Renáta, Awid Adnan, Hegedüs Julianna, Feiszt Péter, Nagy László és Bódi Tibor) munkáját a kísérletek kivitelezésében.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm Gergely Lajos Professzor Úrnak, hogy hasznos tanácsaival és ösztönző kérdéseivel segítette a munkámat, valamint lehetőséget teremtett a kísérletes munka elvégzésére.

Irodalomjegyzék

1. D' Antonio, D., B. Violante., A. Mazzoni, T. Bonfini, M. A. Capuani, F. D' Aloia, A. Iacone, F. Schioppa, and F. Romano. 1998. A nosocomial cluster of *Candida inconspicua* infections in patients with haematological malignancies. *J.Clin. Microbiol.* 36:792-795.
2. Bachmann, S. P., K. VandeWalle, G. Ramage, T. F. Patterson, B. L. Wickes, J. R. Graybill, and J. L. López-Ribot. 2002. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3591-3596.
3. Baily, G. G., C. B. Moore, S. M. Essayag, S. de Wit, J. P. Burnie, and D. W. Denning. 1997. *Candida inconspicua*, a fluconazole-resistant pathogen in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* 25:161-163.
4. Barchiesi, F., A. M. Tortorano, L. F. Di Francesco, M. Cogliati, G. Scalise and M. A. Viviani. 1999. In vitro activity of five antifungal agents against uncommon clinical isolates of *Candida* species. *J. Antimicrob. Chemother.* 43:295-299.
5. Barchiesi, F., D. Arzeni, F. Caselli, and G. Scalise. 2000. Primary resistance to flucytosine among clinical isolates of *Candida* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* 45:401-412.
6. Bartizal, C., and F. C. Odds. 2003. Influences of methodological variables on susceptibility testing of caspofungin against *Candida* species and *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 2100-2107.
7. Bikandi, J., R. S. Millan, M. D. Moragues, G. Cebas, M. Clarke, D. C. Coleman, D. J. Sullivan, G. Quindos, and J. Ponton. 1998. Rapid identification of *Candida dubliniensis* by indirect immunofluorescence based on differential localization of antigens on *C.dubliniensis* blastospores and *Candida albicans* germ tubes. *J. Clin. Microbiol.* 36:2428-2433.
8. Borg-von Zepelin, M., S. Beggah, K. Boggian, D. Sanglard, and M. Monod. 1998. The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Mol. Microbiol.* 28:543-554.
9. Burgess, S. D., R. W. Hasting, K. K. Summers, T. C. Harding, and M. G. Rinaldi. 2000. Pharmacodynamics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Candida albicans*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 36:13-18.
10. Calderone, R. A., and W. A. Fonzi. 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 9:327-335.
11. Cantón, E., J. Pemán, A. Viudes, G. Quindós, M. Gobernado, and A. Espinel-Ingroff. 2003. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 45:203-206.
12. Cassone, A., F. De Bernardis, F. Mondello, T. Ceddia, and L. Agatensi. 1987. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. *J. Infect. Dis.* 156:777-783.

13. Chandra, J., D. M. Kuhn, P. K. Mukherjee, L. L. Hoyer, T. McCormick, and M. A. Ghannoum. 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* 183:5385-5394.
14. Chen, Y.-C., C.-C. Wu, C.-L. Chung, and W.-L. Lee. 2002. Differential secretion of Sap4-6 proteins in *Candida albicans* during hyphae formation. *Microbiology* 148:3743-3754
15. Clancy, C. J., and M. H. Nguyen. 1999. Correlation between in vitro susceptibility determined by E test and response to therapy with amphotericin B: Results from a multicenter prospective study of candidemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1289-1290.
16. Chryssanthou, E., and M. Cuenca –Estrella. 2002. Comparison of the antifungal susceptibility testing subcommittee on antibiotic susceptibility testing proposed standard and the E-test with the NCCLS broth microdilution method for voriconazole and caspofungin susceptibility testing of yeast species. *J. Clin. Microbiol.* 40:3841-3844.
17. Davey, K. G., A. D. Holmes, E. M. Johnson, A. Szekely, and D. W. Warnock. 1998. Comparative evaluation of FUNGITEST and broth microdilution methods for antifungal susceptibility testing of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* 36:926-930.
18. De Bernardis, F., L. Agatensi, I. K. Ross, G. W. Emerson, R. Lorenzini, P. A. Sullivan, and A. Cassone. 1990. Evidence for a role for secreted aspartate proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis. *J. Infect. Dis.* 161:1276-1283.
19. De Bernardis, F., A. Cassone, J. Sturtevant, and R. Calderone. 1995. Expression of *Candida albicans* SAP1 and SAP2 in experimental vaginitis. *Infect. Immun.* 63:1887-1892.
20. De Bernardis, F., M. Boccanera, D. Adriani, E. Spreghini, G. Santoni, and A. Cassone. 1997. Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats. *Infect. Immun.* 65:3399-3405.
21. De Bernardis, F., F. Mondello, G. Scaravelli, A. Pachi, A. Girolamo, L. Agatensi, and A. Cassone. 1999. High aspartyl proteinase production and vaginitis in human immunodeficiency virus-infected women. *J. Clin. Microbiol.* 37:1376-1380.
22. De Bernardis, F., S. Arancia, L. Morelli, B. Hube, D. Sanglard, W. Schafer, and A. Cassone. 1999. Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular SAP2, are virulence factors for *Candida* vaginitis. *J. Infect. Dis.* 179:201-208
23. De Bernardis, F., P. A. Sullivan, and A. Cassone. 2001. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Med. Mycol.* 39:303-313.
24. Berrouane, Y. F., L. A. Herwaldt, and M. A. Pfaller. 1999. Trends in antifungal use and epidemiology of nosocomial yeast infections in a university hospital. *J. Clin. Microbiol.* 37:531-537.
25. Denning, D. W. 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet.* 362:1142-1151.

26. Diekema, D. J., M. A. Pfaller, R. N. Jones, and SENTRY Participants Group. 2002. Age-related trends in pathogen frequency and antimicrobial susceptibility of bloodstream isolates in North America: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2000. *Int. J. Antimicrob. Agents* 20:412-418.
27. Donlan, R. M. 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin. Infect. Dis.* 33:1387-1392.
28. Dooley, D. P., M. L. Beckius, and B. S. Jeffrey. 1994. Misidentification of clinical yeast isolates by using the updated Vitek Yeast Biochemical Card. *J. Clin. Microbiol.* 32:2889-2892.
29. Druz, D. J., and R. I. Lebrer. 1978. Development of amphotericin B-resistant *Candida tropicalis* in a patient with defective leukocyte function. *Am. J. Med. Sci.* 276:77-92.
30. Dupont, B. 2002. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.* 49(Suppl. S1):31-36.
31. Elie, C. M., T. J. Lott, E. Reiss, and C. J. Morrison. 1998. Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* 36:3260-3265 1.
32. Espinel Ingroff, A. 2003. In vitro antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature. *Rev. Iberoam. Micol.* 20: 121-36.
33. Ernst, E. J., K. Yodoi, E. E. Roling, and M. E. Klepser. 2002. Rates and extents of antifungal activities of amphotericin B, flucytosine, fluconazole, and voriconazole against *Candida lusitanae* determined by microdilution, Etest, and time-kill methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:578-581.
34. Essayag, S. M., G. G. Baily, D. W. Denning, and J. P. Burnie. 1996. Karyotyping of fluconazole resistant yeasts with phenotype reported as *Candida krusei* or *Candida inconspicua*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:35-40.
35. Felk, A., M. Kretschmar, A. Albrecht, M. Schaller, S. Beinhauer, T. Nichterlein, D. Sanglard, H. C. Korting, W. Schafer, and B. Hube. 2002. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect. Immun.* 70:3689-3700.
36. Fenn, J. P., H. Segal, B. Barland, D. Denton, J. Whisenant, H. Chun, K. Christofferson, L. Hamilton, and K. Carroll. 1994. Comparison of updated Vitek Yeast Biochemical Card and API 20C yeast identification systems. *J. Clin. Microbiol.* 32:1184-1187.
37. Fidel, P. L., Jr., J. A. Vazquez, and J. D. Sobel. 1999. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:80-96.
38. Fields, B. T., J. H. Bates, and R. S. Abernathy. 1970. Amphotericin B serum concentrations during therapy. *Appl. Microbiol.* 19:955-959.
39. Fridkin, S. K., and W. R. Jarvis. 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:499-511.
40. Goncalves, A. C., C. Pina-Vaz, S. Costa-de-Oliveira, and C. Tavares. 2003. Expression of plasma coagulase among pathogenic *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 41:5792-5793.

41. Gudlaugsson, O., S. Gillespie, K. Lee, B. J. Vande, J. Hu, S. Messer, L. Herwaldt, M. Pfaller, and D. Diekema. 2003. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin. Infect. Dis.* 37:1172-1177.
42. Guinet, R., J. Chanas, A. Goullier, G. Bonnefoy, and P. Ambroise-Thomas. 1983. Fatal septicemia due to amphotericin B-resistant *Candida lusitanae*. *J. Clin. Microbiol.* 18:443-444.
43. Hazen, K. C., J. G. Wu, and J. Masuoka. 2001. Comparison of the hydrophobic properties of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Infect. Immun.* 69:779-786.
44. Hoffman, C., and F. Winston. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57:267-272.
45. Hsu, L. Y., G. E. Minah, D. E. Peterson, J. R. Wingard, W. G. Merz, V. Altomonte, and C. A. Tylenda. 1990. Coaggregation of oral *Candida* isolates with bacteria from bone marrow transplant recipients. *Infect. Immun.* 28:2621-2626.
46. Hube, B., F. Stehr, M. Bossenz, A. Mazur, M. Kretschmar and W. Schafer. 2000. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch. Microbiol.* 174:362-374.
47. Hube, B., and J. Naglik. 2001. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* 147:1997-2005.
48. Ibrahim, A. S., F. Mirbod, S. G. Filler, Y. Banno, G. T. Cole, Y. Kitajima, J. E. Edwards, Jr., Y. Nozawa, and M. A. Ghannoum. 1995. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 63:1993-1998.
49. Jabra-Rizk, M. A., W. A. Falkler, W. G. Merz, J. Y. Kelley, A. A. M. A. Baqui, and T. F. Meiller. Coaggregation of *Candida dubliniensis* with *Fusobacterium nucleatum*. 1999. *J. Clin. Microbiol.* 37:1464-1468.
50. Kao, A. S., M. E. Brandt, W. R. Pruitt, L. A. Conn, B. A. Perkins, D. S. Stevens, W. S. Baughman, A. L. Reingold, G. A. Rothrock, M. A. Pfaller, R. W. Pinner, and R. A. Hajjeh. 1999. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin. Infect. Dis* 29:1164-1170.
51. Kirkpatrick, W. R., S. G. Revankar, R. K. McAtee, J. L. Lopez-Ribot, A. W. Fothergill, D. I. McCarthy, S. E. Sanche, R. A. Cantu, M. G. Rinaldi, and T. F. Patterson. 1998. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar candida screening and susceptibility testing of isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36:3007-3012.
52. M. E. Klepser, E. J. Ernst, M. E. Ernst, S. A. Messer, and M. A. Pfaller. 1998. Evaluation of endpoints for antifungal susceptibility determinations with LY303366. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:1387-1391.
53. Klepser, M.-E., E. J. Renst, R. E. Lewis, M. E. Ernst, and M. A. Pfaller. 1998. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results for standardized methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:1207-1212.
54. Kontoyannis, D. P., and R. E. Lewis. 2002. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 359:1135-1144

55. Kojic, E. M. and R. O. Darouiche. 2004. *Candida* infections of medical devices. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:255-267.
56. Kuhn, D. M., P. K. Mukherjee, T. A. Clark, C. Pujol, J. Chandra, R. A. Hajjah, D. W. Warnock, D. R. Soll, and M. A. Ghannoum. 2004. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerg. Infect. Dis.* 10:1074-1081.
57. Kurtzman, C. P., and C. J. Robnett. 1997. Identification of clinically important Ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 35:1216-1223.
58. Kurtzman, C. P., and C. J. Robnett. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Leeuwenhoek.* 73:331-371.
59. Kurtzman, C. P. 1998. *Issatchenkia Kudryavtsev emend. Kurtzman, Smiley and Johnson*, p. 221-226. In C. P. Kurtzmann and J. W. Fell (ed.), *The yeasts, a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
60. Kurtzman, C. P. 1998. *Pichia E. C. Hansen emend. Kurtzman*, p. 273-352. In C. P. Kurtzmann and J. W. Fell (ed.), *The yeasts, a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
61. M. Laverdiere, C. Resteri, and F. Habel. 2002. Evaluation of the in vitro activity of caspofungin against bloodstream isolates of *Candida* species from cancer patients: comparison of Etest and NCCLS reference methods. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 20:468-471.
62. Lott, T. J., B. M. Burns, R. Zancoppe-Oliveira, C. M. Elie, and E. Reiss. 1998. Sequence analysis of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) from yeast species within the genus *Candida*. *Curr. Microbiol.* 36:63-69.
63. Luo, G., L. P. Samaranayake, and J. Y. Y. Yau. 2001. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J. Clin. Microbiol.* 39:2971-2974.
64. Majoros, L., G. Kardos, C. Miszti, J. Szabó, and B. Szabó. Changes in species distribution of yeasts isolated in the University of Debrecen during a six year period. 23rd International Specialised Symposium on Yeasts. Budapest. 2003 Abstract. O-6-05.
65. Makimura, K., S. Y. Murayama, and H. Yamaguchi. 1994. Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol.* 40:358-364.
66. Manns, J. M., D. M. Mosser, and H. R. Buckley. 1994. Production of hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 62:5154-5156.
67. Masouka, J. 2004. Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:281-310.
68. Meyer, S. A., R. W. Payne, and D. Yarrow. 1998. *Candida Berkhout*, p. 454-573. In C. P. Kurtzmann and J. W. Fell (ed.), *The yeasts, a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
69. Merz, W. G., J. E. Karp, D. Schron, and R. Saral 1986. Increased incidence of fungemia caused by *Candida krusei*. *J. Clin. Microbiol.* 24:581-584.

70. Morace, G., G. Amato, F. Bistoni, G. Fadda, P. Marone, M. T. Montagna, S. Oliveri, L. Polonelli, R. Rigoli, I. Mancuso, S. La Face, L. Masucci, L. Romano, C. Napoli, D. Tato, M. G. Buscema, C. M. C. Belli, M. M. Piccirillo, S. Conti, S. Covan, F. Fanti, C. Cavanna, F. D' Alo, and L. Pitzurra. 2002. Multicenter comparative evaluation of six commercial systems and the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A broth microdilution method for fluconazole susceptibility testing of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 40:2953-2958.
71. Naglik, J. R., G. Newport, T. C. White, L. L. Fernandes-Naglik, J. S. Greenspan, D. Greenspan, S. P. Sweet, S. J. Challacombe, and N. Agabian. 1999. In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infect. Immun.* 67:2482-2490.
72. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards Wayne, Pa.
73. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards Wayne, Pa.
74. Nguyen, M. H., C. J. Clancy, V. L. Yu, Y. C. Yu, A. J. Morris, D. R. Snyderman, D. A. Sutton, and M. G. Rinaldi. 1998. Do the in vitro susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. *J. Infect. Dis.* 177:425-430.
75. Nguyen, M. H., and C. Y. Yu. 1999. Influence of incubation time, inoculum size, and glucose concentrations on spectrophotometric endpoint determinations for amphotericin B, fluconazole, and itraconazole. *J. Clin. Microbiol.* 37:141-145.
76. Nho, S., M. J. Anderson, C. B. Moore, and D. W. Denning. 1997. Species differentiation by internally transcribed spacer PCR and HhaI digestion of fluconazole-resistant *Candida krusei*, *Candida inconspicua*, and *Candida norvegensis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 35:1036-1039.
77. Nucci M, and E. Anaissie. 2001. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clin. Infect. Dis.* 33:1959-1967.
78. Nucci, M., and E. Anaissie. 2002. Should vascular catheters be removed from all patients with candidemia? An evidence-based review. *Clin. Infect. Dis.* 34:591-599.
79. Odds, F. C., M. G. Rinaldi, C. L. Cooper, Jr., A. Fothergill, L. Pasarell, and M. R. McGinnis. 1997. *Candida* and Torulopsis: a blinded evaluation of use of pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 35:313-316.
80. Orozco, A. S., L. M. Higginbotham, C. A. Hitchcock, T. Parkinson, D. Falconer, A. S. Ibrahim, M. A. Ghannoum, and S. G. Filler. 1998. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2645-2649.
81. Ostrosky-Zeichner L., K. A. Marr, J. H. Rex, and S. H. Cohen. 2003. Amphotericin B: time for a new "gold standard." *Clin. Infect. Dis.* 37:415-425.

82. Pappas, P. P., J. H. Rex, J. D. Sobel, S. G. Filler, W. E. Dismukes, T. J. Waals, and J. E. Edwards. 2004. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* 38:161-189.
83. Pappagianis, D., M. S. Collins, R. Hector, and J. Remington. 1979. Development of resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae* infecting a human. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16:123-126.
84. Perea S., and T. F. Patterson. 2002. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin. Infect. Dis.* 35:1073-1080.
85. Peyron, F., A. Favel, A. Michael-Nguyen, M. Gilly, P. Regli, and A. Bolmström. 2001. Improved detection of amphotericin B-resistant isolates of *C. lusitanae* by Etest. *J. Clin. Microbiol.* 39:339-342.
86. Pfaller, M. A., D. J. Diekema, R. N. Jones, H. S. Sader, A. C. Fluit, R. J. Hollis, S. A. Messer, and the SENTRY Participant Group. 2001. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibility to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J. Clin. Microbiol.* 39:3254-3259.
87. Pfaller, M. A., R. N. Jones, G. V. Doern, H. S. Sader, S. A. Messer, A. Houston, S. Coffman, R. J. Hollis, and the SENTRY Participant Group. 2000. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:747-751.
88. Pfaller, M. A., S. A. Messer, L. Boyken, H. Huynh, R. J. Hollis, and D. J. Diekema. 2002. In vitro activities of 5-fluorocytosine against 8,803 clinical isolates of *Candida* spp.: global assessment of primary resistance using National Committee for Clinical Laboratory Standards susceptibility testing methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3518-3521.
89. Pfaller M. A., D. J. Diekema, L. Boyken, S. A. Messer, S. Tendolkar, and R. J. Hollis. 2003. Evaluation of the Etest and disk diffusion methods for determining susceptibilities of 235 bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole and voriconazole. *J. Clin. Microbiol.* 41:1875-1880.
90. Pfaller, M. A., S. A. Messer, L. Boyken, C. Rice, S. Tendolkar, R. J. Hollis, and D. J. Diekema. 2004. Further standardization of broth microdilution methodology for in vitro susceptibility testing of Caspofungin against *Candida* species by use of an international collection of more than 3000 clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42:3117-3119.
91. Pfaller, M. A., D. J. Diekema, S. A. Messer, L. Boyken, R. J. Hollis, and R. N. Jones. 2004. In vitro susceptibilities of rare *Candida* bloodstream isolates to ravuconazole and three comparative antifungal agents. species infrequently isolated from blood. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 48:101-105.
92. Pfaller, M. A., D. J. Sheehan, and J. H. Rex. 2004. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and need for standardization. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:268-280.
93. Ramani, R., S. Gromadzki, D. H. Pincus, I. F. Salkin, and V. Chaturvedi. 1998. Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36:3396-3398.

94. Rangel-Frausto, M. S., T. Wiblin, H. M. Blumberg, L. Saiman, J. Patterson, M. Rinaldi, M. Pfaller, J. E. Edwards, Jr., W. Jarvis, J. Dawson, and R. P. Wenzel. 1999. National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. *Clin. Infect. Dis.* 29:253-258.
95. de Repentigny, L., D. Lewandowski, and P. Jolicoeur. 2004. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:729-759.
96. Rex, J. H., M. A. Pfaller, J. N. Galgiani, M. S. Bartlett, A. Espinel-Ingroff, M. A. Ghannoum, M. Lancaster, F. C. Odds, M. G. Rinaldi, T. J. Walsh, and A. L. Barry for the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. *Clin. Infect. Dis.* 24:235-247.
97. Rex, J. H., M. A. Pfaller, T. J. Walsh, V. Chaturvedi, A. Espinel-Ingroff, M. A. Mahmoud, L. L. Gosey, F. C. Odds, M. G. Rinaldi, D. J. Sheehan, and D. W. Warnock. 2001. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:643-658.
98. Romani, L., F. Bistonian and P. Puccetti. 2003. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:338-343.
99. Sanglard, D., B. Hube, M. Monod, F. C. Odds, and N. A. Gow. 1997. A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect. Immun.* 65:3539-3546.
100. Samaranayake, Y. H., and L. P. Samaranayake. 1994. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J. Med. Microbiol.* 41:295-310.
101. Sandven, P., K. Nilsen, A. Digranes, T. Tjade, and J. Lassen. 1997. *Candida norvegensis*: a fluconazole-resistant species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1375-1376.
102. Schaller, M., W. Schafer, H. C. Korting, and B. Hube. 1998. Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Mol. Microbiol.* 29:605-615.
103. Schaller, M., H. C. Korting, W. Schafer, J. Bastert, W. Chen, and B. Hube. 1999. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol. Microbiol.* 34:169-180.
104. Sheehan, D. J., C. A. Hitchcock, and C. M. Sibley. 1999. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:40-79.
105. Soll, P. R. 1997. Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*. *Microbiology* 143:279-288.
106. Spellberg, B., D. Johnston, Q. T. Phan, J. E. Edwards, Jr., S. W. French, A. S. Ibrahim, and S. G. Filler. 2003. Parenchymal organ, and not splenic, immunity correlates with host survival during disseminated candidiasis. *Infect. Immun.* 71:5756-5764.

107. Sundstrom, P. 2002. Adhesins in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:353-357.
108. Stamos, J. K. and A. H. Rowley. 1994. Candidemia in a pediatric population. *Clin. Infect. Dis.* 20:571-575.
109. E. A. Stone, H. B. Fung, and H. L. Kirschenbaum. 2002. Caspofungin: an echinocandin antifungal agent. *Clin. Ther.* 24:351-357.
110. Szabó, B., L. Majoros, and C. Miszti. 2000. Microbiological diagnosis of fungal infections, p. 198-213. In L. Maródi (ed.), *Emerging infectious diseases in Eastern-Central Europe*. Medicina Publishing House Co., Budapest, Hungary.
111. Swoboda-Kopec, E., D. Kawecki, M. Wroblewska, M. Krawczyk and M. Luczak. 2003. Epidemiology and susceptibility to antifungal agents of fungi isolated from clinical specimens from patients hospitalized in the Department of General and Liver Surgery of the Medical University of Warsaw. *Transpl. Proc.* 35:2298-2303.
112. Torosantucci, A., P. Chiani, F. De Bernardis, A. Cassone, J. A. Calera, and R. Calderone. 2002. Deletion of the two-component histidine kinase gene (CHK1) of *Candida albicans* contributes to enhanced growth inhibition and killing by human neutrophils in vitro. *Infect. Immun.* 70:985-987.
113. Turenne, C. Y., S. E. Sanche, D. J. Hoban, J. A. Karlowsky, and A. M. Kabani. 1999. Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *J. Clin. Microbiol.* 37:1846-1851.
114. Vermes, A., H.-J. Guchelaar, and J. Dankert. 2000. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:171-179.
115. Vonk, A. G., C. W. Wieland, M. G. Netea, and B. J. Kullberg. 2002. Phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* blastoconidia by neutrophils and macrophages: a comparison of different microbiological test systems. *J. Microbiol. Methods* 49:55-62.
116. Walsh, T. J., G. P. Melcher, M. G. Rinaldi, J. Lecciones, D. A. McGough, P. Kelly, J. Lee, D. Callender, M. Rubin, and P. A. Pizzo. 1990. *Trichosporon beigellii*, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. *J. Clin. Microbiol.* 28:1616-1622.
117. Warren, N. G., and H. J. Shadomy. 1991. Yeasts of medical importance, p. 617-629. In A. Balows, W. J. Hausler, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
118. White, T. C., K. A. Marr, and R. A. Bowden. 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:382-402.
119. White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315-322. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
120. Williams, D. W., M. J. Wilson, M. A. O. Lewis, and J. C. Potts. 1995. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.* 33:2476-2479.

121. Witthuhn, F., D. Toubas, I. Béguinot, D. Aubert, C. Rouger, G. Remy, and J. M. Pinon. 1999. Evaluation of the Fungitest kit by using strains from human immunodeficiency virus-infected patients: study of azole drug susceptibility. *J. Clin. Microbiol.* 37:864-866.
122. J. Xu. 2002. Mitochondrial DNA polymorphism in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Genet.* 41:43-47.

Az értekezésben felhasznált közlemények

- I. Majoros, L., G. Kardos, Á. Belák, A. Maráz, L. Asztalos, E. Csánky, Z. Barta, and B. Szabó. 2003. Restriction enzyme analysis of ribosomal DNA shows that *Candida inconspicua* clinical isolates can be misidentified as *Candida norvegensis* with traditional diagnostic procedures. *J. Clin. Microbiol.* **41**:5250-5253.
- II. Majoros, L., G. Kardos, B. Szabó., M. Kovács, and A. Maráz. 2005. Fluconazole susceptibility testing of *Candida inconspicua* clinical isolates: comparison four method. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**:275-276.
- III. Majoros, L., G. Kardos, P. Feiszt, B. Szabó. 2005. Efficacy of amphotericin B and 5-fluorocytosine against fluconazole resistant *Candida inconspicua* clinical isolates *J. Antimicrob. Chemother.* Közlésre elfogadva.
- IV. Majoros, L., G. Kardos, B. Szabó., and M. Sipiczki. 2005. Caspofungin susceptibility testing of *Candida inconspicua*: correlation of different methods with the minimal fungicid concentration. *Antimicrob. Agents Chemother.* Közlésre elfogadva.

Egyéb közlemények

1. Barta, Z., I. Csípő, G. Mekkel, M. Zeher, **L. Majoros**. 2004. Seroprevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn Disease. J. Clin. Microbiol. **42**:5432.
2. Sugita, T., K. Takeo, M. Ohkusu, E. Virtudazo, M. Takashima, E. Asako, F. Ohshima, S. Harada, C. Yanaka, A. Nishikawa, **L. Majoros**, M. Sipiczki, 2004. Fluconazole-resistant pathogens *Candida inconspicua* and *Candida norvegensis* DNA sequence diversity of the rRNA intergenic spacer region, antifungal drug susceptibility, and extracellular enzyme production.. Microbiol. Immunol. **48**:761-766.
3. Szabó, B., C. Miszti, **L. Majoros**, Z. Nábrádi, and Sz. Gomba. 2000. Isolation of rare opportunistic pathogens in Hungary. Case report and short review of the literature. Acta Microbiol. Hung. **47**:9-14.
4. Pócsi, I., L. Sámi, É. Leiter, **L. Majoros**, B. Szabó, T. Emri, and T. Pusztahelyi. 2001. Searching for new type antifungal drugs. Acta Microbiol. Hung.. **48**:533-543.
5. **Majoros, L.**, G. Kardos, I. Pócsi, and B. Szabó. 2002. Distribution and susceptibility of *Candida* species isolated in the Medical University of Debrecen. Acta Microbiol. Immunol. Hung. **49**:351-361.

Fontosabb előadások, poszterek

1. **Majoros, L.,** G. Kardos, C. Miszti, J. Szabó, and B. Szabó. (2003) In vivo investigation of fluconazole resistance in case of *Candida inconspicua*. In program and Abstracts of the 14rd Internationale Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, 2003 Abstract M-13.
1. 2 **Majoros, L.,** G. Kardos, C. Miszti, E. Falusi, and B. Szabó.(2004) *Candida inconspicua* érzékenysége vizsgálat mikrodilúciós módszerrel (standard és emelt inoculum), Fungitest-el és E-teszttel. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése és a X. Fermentációs Kollokvium. 2004. Keszthely.
2. **Majoros, L.,** G. Kardos, I. Pócsi, B. Szabó, and C. Miszti. (2002) Sarjadzó gombák kóroki szerepe az egyes testtájak fertőzései esetén. Ritkábban izolálható *Candida* speciestek klinikai jelentősége. II. Magyar Mikológiai konferencia. 2004. Szeged.
3. **Majoros, L.,** G. Kardos, C. Miszti, and B. Szabó. (2001) Klinikai agyagból izolált sarjadzó gombák species szintű eloszlása és antimikotikumok iránti érzékenysége. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2001. évi Jubileumi Nagygyűlése. 2001. Balatonfüred.
4. **Majoros, L.,** C. Miszti, and B. Szabó. (1999) Isolation and identification of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species from humans by traditional and new methods. In program and Abstracts of the 13rd Internationale Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, 1999 Abstract p-55.
5. Szabó, B., C. Miszti, **L. Majoros,** M. Farkas, and L. Fodor.: Comparison of pathogenicity of human and equine *Rhodococcus equi* strains. FASEB J, 12 A. 574. (1998)