

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

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

**Fidler Gábor**

**Témavezető: Dr. Pahlócsék Melinda**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2021**

# Tartalomjegyzék

<b>1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	<b>4</b>
<b>2. BEVEZETÉS</b> .....	<b>5</b>
<b>3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	<b>7</b>
<b>3.1 Klinikai szempontból jelentős <i>Aspergillus</i> és <i>Candida</i> opportunistá humánpatogén gombák rövid jellemzése</b> .....	<b>7</b>
<b>3.2 Alkalmazott diagnosztikai módszerek a klinikai mikológiában</b> .....	<b>11</b>
3.2.1 Nemzetközileg egységesített betegkategóriák.....	12
3.2.2 Konvencionális gombadiagnosztikai módszerek.....	13
3.2.3 Molekuláris diagnosztikai módszerek .....	15
3.2.3.1 Antigen kimutatáson alapuló diagnosztikai módszerek .....	15
3.2.3.1.1 A galaktomannán ELISA teszt .....	15
3.2.3.1.2 Lateral Flow teszt .....	16
3.2.3.1.3 Az 1-3- $\beta$ -D-glükán egy pánfungális biomarker.....	16
3.2.3.2 Nukleinsav alapú molekuláris diagnosztikai módszerek.....	17
3.2.3.2.1 Kereskedelmi forgalomban hozzáférhető PCR gombadiagnosztikai tesztek .....	18
3.2.3.2.2 Nagyfelbontású olvadási görbe analízis .....	19
3.2.3.2.3 Új-generációs szekvenáláson alapuló diagnosztikai módszerek .....	24
3.2.3.3 Tömegspektrometria a klinikai mikológiában.....	25
<b>3.3 Terápiás stratégiák és antifungális rezisztencia</b> .....	<b>26</b>
3.3.1 A fajalapú diagnózis és célzott terápia jelentősége .....	27
<b>4. CÉLKITŰZÉS</b> .....	<b>29</b>
<b>5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	<b>30</b>
<b>5.1 Referencia törzsek és klinikai izolátumok</b> .....	<b>30</b>
<b>5.2 Tenyésztési módszerek</b> .....	<b>33</b>
<b>5.3 Spóraszuszpenziós oldatok készítése</b> .....	<b>34</b>
<b>5.4 Sejtek feltárása</b> .....	<b>34</b>
<b>5.5 Genomi DNS extrakció</b> .....	<b>34</b>
<b>5.6 PCR reakcióparaméterek optimalizálása</b> .....	<b>35</b>
<b>5.7 PCR inhibíciós kontroll (SPUD esszé)</b> .....	<b>35</b>
<b>5.8 A HRM PCR amplikonok validálása</b> .....	<b>36</b>
5.8.1 <i>Aspergillus</i> HRM PCR amplikonok validálása kapilláris szekvenálással .....	36
5.8.2 <i>Candida</i> HRM PCR amplikonok validálása agaróz gélelektroforézissel.....	37
<b>5.9 Genomi ekvivalens meghatározás</b> .....	<b>37</b>
5.9.1 PCR reakciók kinetikája, dinamikus tartományok .....	38
5.9.2 Intra- és interaszé variancia.....	38
<b>6. EREDMÉNYEK</b> .....	<b>39</b>
<b>6.1 Az <i>Aspergillus</i> és <i>Candida</i> HRM primerek</b> .....	<b>39</b>
<b>6.2 Optimális HRM PCR reakcióparaméterek</b> .....	<b>42</b>
6.2.1 HRM PCR amplikonok validálása a meghatározott reakcióparaméterekkel.....	45
<b>6.3 Az <i>Aspergillus</i> HRM PCR olvadási görbék jellemzése</b> .....	<b>47</b>
<b>6.4 A <i>Candida</i> HRM PCR olvadási görbék jellemzése</b> .....	<b>51</b>

<b>6.5 Esszé keresztreakciók</b> .....	53
<b>6.6 Analitikai szenzitivitás és a HRM módszerek megbízhatósága</b> .....	54
6.6.1 Dinamikus tartomány, detektálási határ (LoD) .....	54
6.6.2 Fajazonosítás határa (LoI) .....	56
6.6.3 Intra- és interesszé variancia.....	58
<b>6.7 A MycoAnalyzer kiértékelő szoftver</b> .....	61
<b>7. MEGBESZÉLÉS</b> .....	62
<b>8. ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	66
<b>9. SUMMARY</b> .....	67
<b>10. IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	68
<b>11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	84
<b>12. TÁRGYSZAVAK</b> .....	85
<b>13. KEYWORDS</b> .....	86
<b>14. FÜGGELÉK – SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE</b> .....	87

## 1. Rövidítések jegyzéke

**BAL** Bronchoalveoláris lavage

**BenA** *Beta-tubulin* gén

**BG** 1-3- $\beta$ -D-glükán

**CaM** *Kalmodulin* gén

**CDCA** Centers for Disease Control Antibiotic

**Cq** Valós idejű PCR készüléken, a kimutatási határ túllépéséhez szüksége ciklusok száma

**CT** Számítógépes tomográfia

**CV** Variációs koefficiens

**ECMM** European Confederation of Medical Mycology

**ELISA** Enzimhez kapcsolt immunoszorbens teszt („Enzyme-linked immunosorbent assay”)

**EORTC** European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group

**ERS** European Respiratory Society

**ESCMID** European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

**FDA** Food and Drug Administration

**GE** Genomi ekvivalens

**GM** Galaktomannán

**HIV** Humán immundeficiencia vírus

**HRM** Nagyfelbontású olvadási görbe analízis

**IgM** Immunoglobulin M

**ISHAM** International Society for Human and Animal Mycology

**ITS** *Internal transcribed spacer* génrégió

**LoD** Detektációs határ („Limit of detection”)

**LoI** Megbízható fajazonosítás alsó határa („Limit of identification”)

**MALDI-TOF** Mátrix asszociált lézer deszorpciós ionizáció-repülési idő

**MRI** Mágneses rezonancia interferencia

**MSG** Mycoses Study Group

**NCBI** National Center for Biotechnology Information

**PCR** Polimeráz láncreakció

**PET** Pozitronemissziós tomográfia

**SDS** Nátrium dodecil szulfát

**SPECT** Egyfoton kibocsátásos számítógépes metszeti képalkotás („Single photon emission computed tomography”)

**T<sub>m</sub>** Olvadáspont

**UV** Ibolyán túli sugarak

**WHO** World Health Organization

## 2. Bevezetés

Az opportunista humánpatogén gombafajok által okozott invazív megbetegedések és a rezisztens gombatörzsek egyre növekvő száma egyaránt világméretű gondot jelentenek, amelynek következtében több mint 1.6 millió ember hal meg évente (**Bongomin és mtsai. 2017**). Kiemelten veszélyeztetett csoportba tartoznak a vérképzőszervi daganatos megbetegedésekben szenvedők, az őssejt- vagy szervtranszplantáción átesettek és a HIV fertőzöttek (**Brown és mtsai. 2012**). Az egyébként is súlyos alapbetegségek szövődményeként fellépő szisztémás gombainfekciók időben megkezdett hatékony antifungális terápia nélkül a betegek életkilátásait jelentősen rontják, továbbá növelik a kórházi ellátás időtartamát illetve annak költségeit (**Ramana és mtsai. 2013**).

Az invazív mikózisok fő okozói az *Aspergillus fumigatus* és *Candida albicans* gombafajok (**Pagano és mtsai. 2006**), azonban az immunszuppresszív terápiás gyógyszerek, a széles spektrumú antibiotikumok egyre elterjedtebb alkalmazásának, illetve olyan egyéb tényezők, mint a klímaváltozás következményeként a két nemzetség más tagjainak előfordulása egyaránt növekszik (**Holzheimer és Dralle 2002; Lass-Flörl 2009**). A növekvő tendencia mellett aggasztó, hogy az utóbbi időben a klinikumban megjelent gombatörzsek bizonyítottan eltérő virulenciával és antifungális rezisztencia profillal rendelkeznek (**Zmeili és Soubani 2007; Alcazar-Fuoli és mtsai. 2008; Szigeti és mtsai. 2012**), emiatt az Egyesült Államokban illetve a dél-amerikai régiókban is számoltak már be antimikotikum rezisztens nozokomiális járványokról, melyek igen magas mortalitást mutattak a rizikócsoportba tartozó betegek körében (**Benedict és mtsai. 2017; Thomaz és mtsai. 2018**). Mindezeket figyelembe véve a faji szintű diagnózis és a rezisztenciaszűrés egyaránt kulcsfontosságúak, és hozzájárulhatnak a megfelelő antifungális szer megválasztásához (**Balajee és mtsai. 2007**). Az elsődleges prophylaxis, illetve az empirikus terápiás stratégiák csökkenthetik a mortalitást, ugyanakkor fennáll annak az esélye, hogy szükségtelenül terhelik a betegek szervezetét a súlyosan citotoxikus antifungális gyógyszerekkel (**Dib és mtsai. 2018**). Az invazív gombafertőzések korai felismerése a gyakran aspecifikus tünetek miatt (köhögés, mellkasi fájdalom, láz) kihívás. Legmegfelelőbb klinikai indikátorok közé tartozik az antibiotikumos kezelésre sem szűnő neutropéniás láz. Ennek során a 38°C feletti testhőmérséklet mellett az abszolút neutrofilszám tartósan 500 sejt/mikroliter határérték alá csökken (**Heinz és mtsai. 2017**).

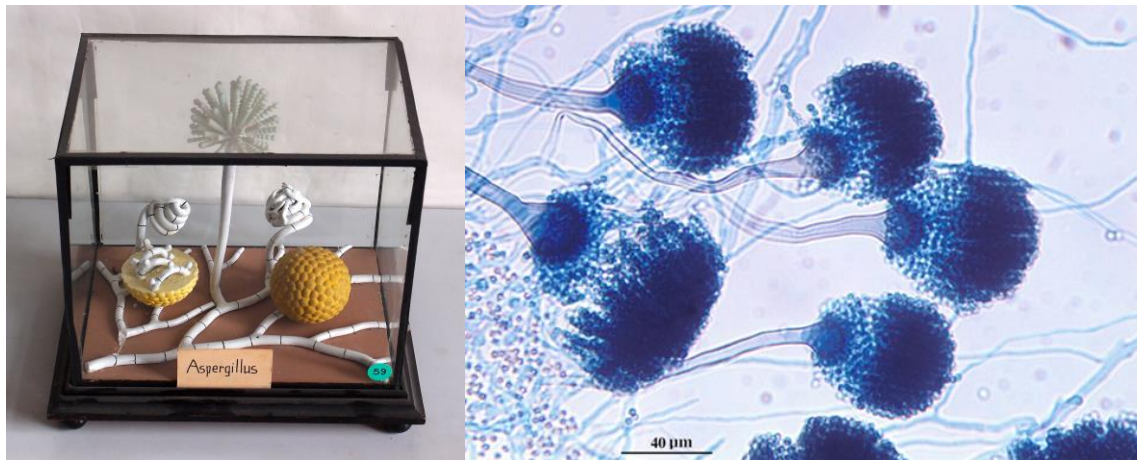
A rutin gombadiagnosztikában használt képalkotó módszerek sem specifikusak, így nem lehet nagy biztonsággal kijelenteni, hogy a képi elváltozás háttérében gombafertőzés áll (**Hayes és Novak-Frazer 2016**). A gombák tenyésztése időigényes, és a közeli rokonfajok megkülönböztetése az átfedő morfológiai jegyek miatt ugyancsak kihívás (**Pfeiffer és mtsai. 2011; Barton 2013; Safavieh és mtsai. 2017**). Annak ellenére, hogy a molekuláris antigén alapú módszerek szenzitív és gyors diagnózist tesznek lehetővé, sem az *Aspergillus* fertőzések kimutatására kifejlesztett molekuláris „gold standard” galaktomannán ELISA tesztek, sem a pánfungális 1-3- $\beta$ -D-glükán tesztek nem szolgáltatnak faji szintű eredményt (**Delaloye és Calandra 2014**). A gombafajok genetikai azonosítására legelterjedtebben a riboszómális RNS kódoló géneket (*18S*, *28S*) és a köztük elhelyezkedő „*internal transcribed spacer*” (*ITS*) régiókat használják (**Liu és mtsai. 2012; Vu és mtsai. 2019**). Az *ITS* gének alkalmasak az *Aspergillus* alnemzetségek elkülönítésére, de a különböző *Aspergillus* fajszekciókon belül sokkal pontosabb fajmeghatározást tehetnek lehetővé, amennyiben olyan fehérjekódoló, részben konzervált géneket használnak, mint a *béta-tubulin*, *aktin* vagy *kalmodulin* (**Balajee és mtsai. 2007**). Az új-generációs szekvenálás mellett a polimeráz láncreakción (PCR) alapuló módszerek is alkalmazhatók diagnosztikai célokra, de a különböző laborok által fejlesztett esszék és protokollok nagyfokú heterogenitása miatt a standardizáció továbbra is megoldatlan. Ebből kifolyólag e technológiák rutin gombadiagnosztikai felhasználása még mindig kihívást jelent, továbbá a kereskedelmi forgalomban lévő PCR tesztek többnyire csak a fő gombapatogének (*Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*) faji szintű kimutatására összpontosítanak.

A fentebb taglalt tényezőket figyelembe véve igény mutatkozik a klinikai mikológiában olyan nukleinsav alapú diagnosztikai módszerek kidolgozására, melyek az *Aspergillus* illetve *Candida* nemzetségbe tartozó patogének széles spektrumát képesek faji szinten kimutatni. A HRM PCR módszert eredetileg genetikai variánsok kimutatására fejlesztették ki, viszont egyre elterjedtebben alkalmazzák különböző baktériumok, vírusok, illetve gombák genetikai azonosítására is (**Stephens és mtsai. 2008; Steer és mtsai. 2009; Slany és mtsai. 2010; Somogyvári és mtsai. 2012**). Szakirodalmi adatok alapján a gombadiagnosztikai HRM tesztek jelentős többsége az *ITS* génekre specifikus (**Mandviwala és mtsai. 2010; Nemcova és mtsai. 2015; Libert és mtsai. 2017**). Kutatásunk fő célja olyan HRM PCR esszék kifejlesztése és optimalizálása volt, amelyek a gomba  *$\beta$ -tubulin* gének szekvenciaeltérései alapján lehetővé teszik több klinikailag releváns *Aspergillus* és *Candida* gombafaj egyszerű, gyors és költséghatékony elkülönítését.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1 Klinikai szempontból jelentős *Aspergillus* és *Candida* oportunista humánpatogén gombák rövid jellemzése

Az *Aspergillus* nemzetség tagjai olyan kozmopolita, szaprofita gombafajok, amelyek egyaránt kiemelkedő mezőgazdasági, biotechnológiai és klinikai jelentőséggel bírnak (Samson és mtsai. 2014). Elsőként Pier Antonio Micheli olasz botanikus írta le őket 1729-ben. Nevüket az aszpergillumról (szenteltvízhintő) kapták (1. ábra), mivel konidiofóruk alakja ahhoz hasonlít (Tsang és mtsai. 2018). A nemzetség nagyon szerteágazó, már a körülbelül 350 *Aspergillus* faj rendszertani besorolása sem egyszerű feladat (Kocsubé és mtsai. 2016; Samson és mtsai. 2014).



**1. ábra:** Bal oldalon: David Ludwig által készített kiállított *Aspergillus* modell a griefswaldi botanikai múzeumban (Németország). Jobb oldalon: Az *Aspergillus fumigatus* mikroszkópos képe. (forrás: <http://geoffrey-reedlife.blogspot.com/2013/02/microscopic-morphology-of-aspergillus.html>)

Az *Aspergillus* ubikviter gombaspórák gyakorlatilag mindenhol előfordulnak a környezetünkben. Minden ember meglepően nagy mennyiségű gombaspórát lélegez be naponta, és az *Aspergillus* spórák 2-5 µm-es méretükből adódóan az alveolusokba is képesek bejutni (Richardson és mtsai. 2019). Ezek azonban a teljesen egészséges egyénekre többnyire ártalmatlanok, mivel az alveoláris makrofágok bekebelezik és eliminálják a spórákat (Filler és Sheppard 2006). Mindazonáltal nagy mennyiségű gombaspóra tartós belélegzése allergiás eredetű betegségeket okozhat. Ebből is következik, hogy a mezőgazdasági dolgozók és bizonyos esetekben erős dohányosok körében gyakrabban fordul elő az úgynevezett „farmer’s lung”, amely az immunrendszer túlzott aktivitásától kialakuló tüdőgyulladás (Mitsui és mtsai. 2012). Ilyen jellegű

megbetegedés a főként asztmásokat vagy cisztikus fibrózisban szenvedőket érintő allergiás bronchopulmonáris aszpergillózis (**Knutsen és Slavin 2011**). A tüdőaszpergillózis nem invazív formája az aszpergillóma, amely leggyakrabban a tuberkulózis kísérőbetegsége. A kavitáció (sejtnekrózis miatt kialakuló üregesedés) következtében a gombaspórák a tüdőüregekben képesek megtapadni, és a fejlődő gombahifák az erőteljes nekrotikus folyamatok eredményeként keletkező sejttörmelékekkel összetapadva egy gömb formájú képződményt alkotnak (**Moodley és mtsai. 2014**). A tüdőaszpergillózis legsúlyosabb formája az akár életet is veszélyeztető, és időben megkezdett terápia nélkül magas mortalitású invazív tüdőaszpergillózis.

Az invazív tüdőaszpergillózis kialakulása főként súlyos immunhiányos állapothoz köthető, éppen ezért kiemelten veszélyeztetett csoportba a vérképzőszervi daganatokban szenvedők, az őssejt- és szerv transzplantáltak, a HIV fertőzöttek és a hosszú távú szteroid kezelés alatt állók tartoznak (**Sacarlal és Denning 2018**). Legfőbb rizikótényezők az immunszuppresszió, neutropénia, lymphopénia és a T-sejt deplécio (**Kaya és mtsai. 2017; Lauruschkat és mtsai. 2018**).

Megfelelő immunválasz nélkül a tüdőbe bekerülő spórákat az alveoláris makrofágok nem képesek maradéktalanul semlegesíteni, ezért azok képesek megtelepedni. A növekvő hifák a környező szövetekbe hatolnak és erőteljes sejtnekrózis következik be. Ezt követi a fertőzés angioinvazív szakasza, amely során az előre nyomuló hifák miatt az érfalak integritása sérül. Végül az ereken áthatoló hifákról gombasejtek válnak le (disszeminálnak), melyek a véráram útján más szervekhez (máj, vese) jutnak el, és ott megtelepedve rontják azok funkcióit (**Aimanianda és mtsai. 2009**). Fontos megemlíteni, hogy a hifadarabok képesek a vér-agy gáton is átjutni, melynek következtében központi idegrendszeri aszpergillózis alakulhat ki, amely az *Aspergillus* angioinvazív képessége miatt akár olyan súlyos és életet fenyegető szövődeményhez vezethet, mint például az agyvérzés (**Anciones és mtsai. 2018; Neyaz és mtsai. 2018**).

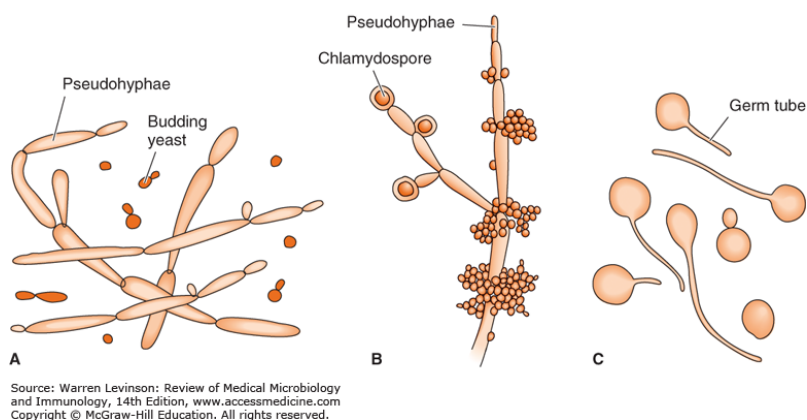
Az aszpergillózis kialakulásáért leggyakrabban az *Aspergillus fumigatus* felelős, melyet az *Aspergillus lentulus*, a nagyfokú gyógyszerrezisztenciát mutató *Aspergillus terreus*, a trópusi és szubtrópusi vidékeken gyakran előforduló *Aspergillus flavus* és *Aspergillus niger* követnek (**Howard és mtsai. 2009; Alastruey- Izquierdo és mtsai. 2012; Steinbach és mtsai. 2012; Sharma és mtsai. 2018**).



**Bongomin** és **mtsai.** által 2017-ben végzett epidemiológiai becslés alapján, az évente regisztrált allergiás bronchopulmonáris aszpergillózis esetek száma 5 millió, a krónikus pulmonáris aszpergillózis eseteké 3 millió, és az invazív aszpergillózis betegeké több mint 300 000. Ugyanakkor a szerzők feltételezik, hogy az invazív aszpergillózis tekintetében a veszélyeztetettek száma meghaladhatja az évi 10 milliót (**Bongomin és mtsai. 2017**). Számottevő epidemiológiai adatokról számolnak be a *Candida* gombák által okozott fertőzések kapcsán is. Az invazív candidiázissal diagnosztizáltak száma eléri a 750 000-et, a HIV pozitív betegek körében 2 millió szájüregi candidiázis esetet írtak le és a vulvovaginális candidiázisban szenvedők száma körülbelül 134 millió évente (**Bongomin és mtsai. 2017**).

A *Candida* opportunista humánpatogén gombafajok rendszertanilag az élesztőgombafélék családjába tartoznak. Ezek a gombák szerves részét képezik a humán holobiomnak, az egészséges emberek 60 százalékában a bőrön, belekben, genitális régiókban illetve a szájüregben fordulnak elő. Kommenzalizmusban élnek a többi mikróbával, de amennyiben a testkörnyezet megváltozása a gombának kedvez, intenzív kolonizáció következik be, az asztalközösség megbomlik, és így a gomba patogénné válik (**Tang és mtsai. 2016**).

A *Candida* gombák szaporodása pleiomorf jellegű (**2. ábra**), vagyis környezeti körülményektől függően háromféle szaporodási forma érvényesülhet: 1) a penészgombákra jellemző valódi hifaképzés, 2) pszeudohifa képzés, 3) az élesztőgombákra jellemző sarjadzás (**Sudbery és mtsai. 2004**). Feltételezik, hogy a reverzibilis fenotípusváltó képességük fontos szerepet játszik a patogenitásukban, penetranciájukban és a biofilm képzésükben (**Veses és Gow 2009; Tsui és mtsai. 2016**).



**2. ábra: A *Candida* gombák szaporodási formái** (forrás: Warren Levinson: Review of Medical Microbiology and Immunology, 14th Edition, McGraw-Hill Education, 2016)

A *Candida* gombafajok túlzott elszaporodása a szervezetben található fizikai barrierek sérülésének, a mikrobiom összetétel megváltozásának és a megfelelő immunvédekezés hiányának következménye (**Pappas és mtsai. 2018**). Mindezek velejárója számos *Candida* eredetű betegség lehet, melyek közül legsúlyosabb az invazív candidiázis, amelynek leggyakoribb formája a candidémia.

Candidémia során az invazív aszpergillózishoz hasonlóan a gombasejtek a véráramba jutnak, és olyan életveszélyes szövődményt okozhatnak, mint például a septicus sokk, melynek mortalitása akár a 87%-ot is elérheti (**Guzman és mtsai. 2011**). A gombasejtek ugyanakkor a véráram útján több szervet és szövetet is megtámadhatnak (vese, máj, tüdő, szem, szívizomzat, csontszövetek, gerincvelő), és mivel képesek átjutni a vér-agy gáton, így a központi idegrendszert is károsíthatják, ezáltal olyan további súlyos komplikációk alakulhatnak ki, mint az endocarditis, endophthalmitis, osteomyelitis vagy meningitis (**Yapar 2014**). Fő rizikótényezők a centrális vénakatéterezés, a hasüreget érintő műtéti eljárások, a hosszútávú szélesspektrumú antibiotikus kezelések és a vérképzőszervi daganatos megbetegedések (**Kullberg és Arendrup 2015**). A candidémia incidenciája összefüggésbe hozható az életkorral.

Legalább 15 különböző *Candida* fajt írtak már le, amelyek valamilyen humán megbetegedéshez köthetők, de az invazív candidiázis kialakulása az esetek 95%-ában az alábbi öt fajhoz köthető: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* és *Candida krusei* (**McCarty és Pappas 2016**). A *Candida* opportunistá humánpatogén gombafajok megoszlása a klinikumban az elmúlt időben jelentősen megváltozott, és az eddig domináns *Candida albicans* mára csak a fertőzések közel felénél figyelhető meg (**Guinea és mtsai. 2014; Cleveland és mtsai. 2015**).

Az észak-európai, egyesült államokbeli és kanadai régiókban a *Candida albicans* mellett fontos kórokozónak számít a *Candida glabrata*, míg a dél-európai, ázsiai és latin-amerikai országokban a *Candida parapsilosis* és *Candida tropicalis* által okozott fertőzések előfordulása mutat növekvő tendenciát (**Andersen és mtsai. 2016; Lamoth és mtsai. 2018**). Ezek a fajok eltérő virulenciával rendelkeznek, amely eredendően hatással van a terápia kimenetelére és a betegek túlélési esélyeire (**Arendrup és mtsai. 2002**). Habár a *Candida parapsilosis* által okozott candidémia alacsony mortalitást mutat, azonban a különböző orvostechikai eszközökön és implantátumokon képes biofilmeket képezni, amely akár súlyos kórházi infekciókhoz vezethet (**Vaz és mtsai. 2011**). Más

fajok, mint a *Candida dubliniensis* vagy *Candida guilliermondii* által okozott fertőzések főként meghatározott betegcsoportoknál figyelhetőek meg. A *Candida dubliniensis* (amelyet elsőként egy HIV pozitív betegből izoláltak az 1990-es években) által okozott szájüregi fertőzések igen gyakoriak HIV fertőzötteknél (Sullivan és mtsai. 1995; Livério és mtsai. 2017). Mindezeket túl jelentős aggodalomra ad okot a multidrog rezisztens *Candida glabrata* és *Candida auris* patogén törzsek egyre növekvő száma is (Healey és mtsai. 2016; Osei Sekyere 2018).

Intenzíven kutatott terület a mikroorganizmusok biofilm képző tulajdonsága, melynek fontos szerepe van a gombák túlélésében, ellenállóképességében illetve a gyógyszerrezisztenciában. A folyamat alapvetően három fázisra bontható: I) A korai fázisban a gombasejtek megtapadása történik, amelyet jellemzően az adhezin sejt felszíni fehérjék segítik, amelyek révén a gombák a gazdasejtekhez, különböző baktériumokhoz, abiotikus felületekhez és egymáshoz kapcsolódnak. II) A középső szakaszban a gombák poliszacharidokat és fehérjéket szekretálnak az extracelluláris térbe. Ezek a folyamatok morfológiai változásokat idéznek elő a biofilmben, és egy zselé állagú háromdimenziós struktúra alakul ki, amely megvédi a gombasejteket a fagocitózistól és az antifungális szerek sem képesek hozzáférni a sejtekhez. III) Az utolsó szakaszban történik a maturáció, és a biofilm darabok leválásával metasztatizál alakul ki (Cavalheiro és Teixeira 2018). A biofilm képzés az *Aspergillus* és *Candida* gombákra egyaránt jellemző, azonban a két nemzetségen belül eltérés mutatkozik az egyes fajok által kialakított biofilm mátrix összetételében és annak vastagságában. A betegség típusától függően a gomba szintén eltérő összetételű biofilmeket képez, például aszpergillóma esetén az *Aspergillus fumigatus* jellemzően  $\alpha$ -1,3-glükánokat és melanint választ ki az extracelluláris térbe, amely például invazív aszpergillózisnál egyáltalán nem jellemző (Beauvais és Latgé 2015).

### 3.2 Alkalmazott diagnosztikai módszerek a klinikai mikológiában

Az invazív mikózisok korai fajalapú diagnózisa napjainkban is nagy kihívást jelent a mikrobiológiai laboratóriumok számára. A betegekből izolált gombák gyakran nem megszokott morfológiát mutatnak, ezért a fenotípus alapján történő fajazonosítás nehézkes. Emellett a környezeti kontamináció okozhat álpozitív eredményeket, ugyanakkor bizonyos mintatípusok (nyák, köpet) esetén a gombákat *in vitro* túlnövő baktériumok álnegativitáshoz vezethetnek (Jones és mtsai. 2014). A tenyésztés mellett az elmúlt évtizedekben fokozatosan előtérbe kerültek a

molekuláris diagnosztikai módszerek, és ugyancsak egyre több új innovatív technológia jelent meg a piacon. Ezek, beleértve a PCR gombadiagnosztikai tesztek is, gyakran nem standardizáltak és kivitelezésük, kiértékelésük külön szaktudást igényel, ezért nehezen illeszthetők be a rutin diagnosztikába.

### 3.2.1 Nemzetközileg egységesített betegkategóriák

2002-ben az „European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group” (EORTC) és a „National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group” (MSG) csoport egy 3 fokozatú betegkategorizálási rendszert határozott meg. Ez a kategória rendszer alkalmazható az immunszupprimált hematológiai daganatokban szenvedők, őssejt-transzplantáltak és cisztikus fibrózisos betegek esetében, így segítve a különböző klinikai és epidemiológiai tanulmányokat. A három csoport: „proven” (bizonyított), „probable” (valószínű) és „possible” (lehetséges) (Ascioglu és mtsai. 2002; De Pauw és mtsai. 2008). Említésre méltó, hogy a nukleinsav alapú diagnosztikai módszerek csak 2019 óta szerepelnek a hivatalos EORTC/MSG ajánlásban (Donnelly és mtsia. 2019).

- **„proven”**: A fertőzés igazolásához szükséges az érintett szövetrészből steril mintavételt követően hisztológiai úton, vagy közvetlen vérből tenyésztéssel a gomba jelenlétének bizonyítása. A gombastruktúrák hisztopatológiai kimutatása a fertőzött szövetben Grocott-Gömöri féle ezüstimpregnációval vagy perjódsvav-Schiff festéssel történik. Ezt kiegészítően szükséges tenyésztéssel a kórokozó nemzetség vagy faji szintű azonosítása. Ezek hiányában a fertőzés eredete nem határozható meg egyértelműen. A legfrissebb 2019-es iránymutatás kiegészítése alapján igazolható a fertőzés, amennyiben a betegből izolált formalin fixált paraffinba ágyazott szöveti mintában PCR módszerrel sikeresen detektálják a patogént, és új-generációs szekvenálással fajsztinten azonosítják a gombát. Ez azonban kizárólag csak abban az esetben ajánlott, amennyiben a gomba jelenlétét hisztopatológiai vizsgálat már előzetesen igazolta.
- **„probable”**: A neutropéniás láz megjelenik és ismert olyan kórelőzmény, amely rizikótényezőnek tekinthető (őssejttranszplantáció, szteroid kezelés). Emellett szükséges valamilyen képalkotó diagnosztikai eljárással (CT, MRI) kimutatott elváltozás, és a gombafertőzés megerősítése antigén alapú molekuláris diagnosztikai teszttel (galaktomannán,  $\beta$ -D-glükán) vagy tenyésztéssel. A PCR módszert önmagában is

alkalmasnak találták abban az esetben, ha: a) Plazma, szérum vagy teljes vérmintából mért két vagy több egymást követő pozitív PCR teszt, b) bronchoalveoláris lavage (BAL) folyadékból igazolt két vagy több pozitív PCR teszteredmény, c) legalább egy pozitív PCR eredmény plazma, szérum, teljes vérmintán és egy pozitív PCR BAL folyadékon.

- „**possible**”: A beteg rizikócsoporthoz tartozik és a klinikai tényezők (neutropeniás láz és képalkotással kimutatott szervi elváltozás) is megjelennek, de a gombafertőzést bizonyító mikológiai tényezők (tenyésztés és antigén alapú tesztelés eredménye negatív) hiányoznak.

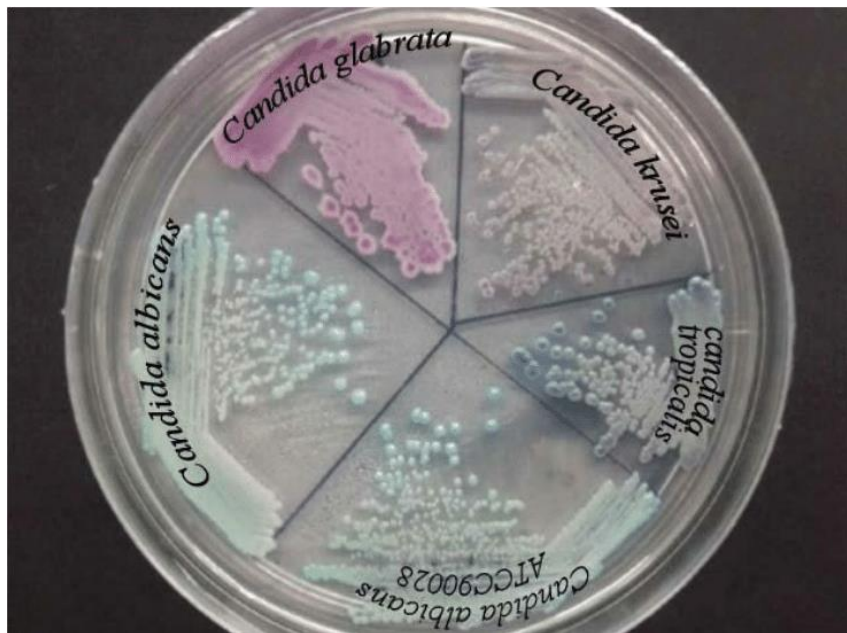
### 3.2.2 Konvencionális gombadiagnosztikai módszerek

A hisztopatológiai vizsgálatok, a klasszikus mikrobiológiai- (mikroszkópia és tenyésztés), és a képalkotó módszerek egyaránt szerves részét képezik a rutin diagnosztikának (**Ruhnke és mtsai. 2012**).

Hisztopatológiai vizsgálatok a fertőzött szövetrészeiről történő steril biopsziás mintavételt követően a gomba jelenlétére specifikus festési eljárásokon alapulnak. A klinikai mikológiában mikroszkópos vizsgálatokhoz legelterjedtebben használják a perjódsvav-Schiff, illetve Grocott-Gömöri féle methamin-ezüst festési módszereket, amelyek során a gomba sejtfalában található poliszacharidok oxidációja következtében keletkező aldehid csoportokat mutatják ki (**Rickerts és mtsai. 2007; Vyzantiadis és mtsai. 2012; Heaton és mtsai. 2016**). Emellett fluoreszcens mikroszkópiában optikai erősítőként már régóta alkalmazzák a „calcofluor white” festéket, amely gombák sejtfalában található kitinhez kötődik (**Monheit és mtsai. 1984; Hamer és mtsai. 2006; Kingsbury és mtsai. 2012**). Sajnos ezek a módszerek gyakran még nemzetség szinten sem képesek elkülöníteni a gombákat, továbbá a mintavételi eljárás módja jelentősen befolyásolja a szenzitivitást (**Shen és mtsai. 2017**).

Mikrobiológiai laboratóriumokban a gombák tenyésztéséhez általánosan Saboraud agar táptalajt alkalmaznak (**Gadea és mtsai. 2007**). Az alap táptalajt gyakran egészítik ki kloramfenikol antibiotikummal a bakteriális kontamináció kizárására (**Cuenca-Estrella és mtsai. 2011; Swoboda-Kopec és mtsai. 2017**). A tenyésztés általában 30 °C hőmérsékleten történik, amelynek emelésével bizonyos gombafajok elkülöníthetők. Például 50 °C-os inkubáció mellett a *Candida* gombák nem képesek növekedni, de az *Aspergillus fumigatus* igen (**Ullmann és mtsai. 2018**). A kromogén szubsztrátokat tartalmazó táptalaj (CHROMagar) alkalmazása (**3. ábra**), lehetővé teszi három *Candida* faj megkülönböztetését. A szubsztrátok a fajok által termelt enzimekkel reakcióba

lépve a *Candida albicans* esetén zöld, *C. tropicalis* jelenlétében kék, *C. krusei* fajoknál pedig rózsaszín gombatelepeket eredményeznek (Willinger és Manafi 1999; Nadeem és mtsai. 2010). A fajmeghatározás ezzel a módszerrel 24-72 órát vesz igénybe, és a *C. glabrata* esetében megfigyelhető rózsaszín telepképződés sok esetben nem különíthető el egyértelműen más hasonló elszíneződést eredményező gombafajoktól (Odds és mtsa. 2000).



3. ábra: *Candida* fajok elkülönítése CHROMagaron történő tenyésztéssel (forrás: Mudhigeti és mtsai. 2014)

A betegekből izolált gombafajok rezisztencia vizsgálatára leggyakrabban a Kirby-Bauer féle korong diffúziós módszert használják, amely során a táptalajra különböző hatóanyag tartalmú antimikotikum korongokat helyeznek és a növekedésgátló hatásuk alapján következtetnek a gombatelepek érzékenységére és dózisfüggésére (Tulasidas és mtsai. 2018). A tenyésztésen alapuló módszerek legnagyobb hátránya, hogy időigényesek, a közeli rokon gombafajok fenotípusos elkülönítése nem lehetséges, és nagy a környezeti kontamináció veszélye.

Ugyancsak az elsődleges diagnosztika részét képezi a mellkas röntgen vagy a számítógépes tomográfia (CT), de ezek a módszerek nem képesek minden kétséget kizáróan kimutatni a gombafertőzéseket (Panse és mtsai. 2016). Az EORTC/MSG irányelvek alapján invazív aszpergillózisra utaló jel lehet, ha a beteg CT felvételén megjelenik az úgynevezett „halo sign” vagy az „air-crescent sign” (De Pauw és mtsai. 2008). A pozitív CT felvételen megjelenő tömör,

jól körülhatárolt, fehér, tejüveg-szerű holdudvar képlet („halo sign”) a nekrotikus folyamatok és szöveti bevérzések következménye is lehet, illetve bakteriális eredetű fertőzésre is utalhat. **Brodoefel és mtsai. (2006)** leírták, hogy az aszpergillózis kialakulásának első napján a neutropeniás betegek 88-96%-nál jelenik meg ez a képi elváltozás, majd a fertőzést követő 72 órában a betegek egyharmadánál, és két hét elteltével szinte az összes betegnél eltűnik. Számos tanulmány hivatkozik a radioaktívan jelölt ( $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ) *Aspergillus* specifikus kontrasztanyagok, mint például MORF oligomerek, sziderofórok vagy monoklonális antitestek diagnosztikus értékére a SPECT, PET/CT képalkotásban (**Petrik és mtsai. 2010; Wang és mtsai. 2013; Davies és mtsai. 2017; Thornton 2018**).

### 3.2.3 Molekuláris diagnosztikai módszerek

A molekuláris gombadiagnosztikai módszerek három fő típusa különíthető el a detektált biomarkerek alapján: 1) antigén alapú szerológia (pl. ELISA), olyan sejtfalalkotó poliszacharidokat mutat ki, melyek megtalálhatók a gombákban, 2) nukleinsav alapú diagnosztikai módszerek (PCR, szekvenálás), 3) módszerek, melyek a patogénre jellemző fehérje mintázat alapján azonosítják a gombát (pl. tömegspektrometria).

#### 3.2.3.1 Antigén kimutatáson alapuló diagnosztikai módszerek

##### 3.2.3.1.1 A galaktomannán ELISA teszt

A galaktomannán (GM) az *Aspergillusok* sejtfalát alkotó poliszacharid, amely egy mannóz gerincből és az ahhoz kapcsolódó galaktofurán oldalláncokból áll. Ezt a 35-200 kDa molekulatömegű biopolimert a gomba az aktív növekedési fázisában szekretálja az extracelluláris térbe, és jelentős szerepet tölt be a biofilm képzésben (**Latgé és mtsai. 1994**).

A „gold-standard” Platelia<sup>TM</sup> *Aspergillus* antigén teszt (Bio-Rad, Franciaország) a patkány EB-A2 monoklonális IgM antitesten alapul, amely szelektíven kötődik a galaktomannán  $\beta$ -1-5 galaktofuranozil alegységéhez. Az antigén és a jelölt antitest kötődése fotometriásan mérhető, és a GM mennyisége a kapott optikai denzitási értékekből meghatározható (**Mennink-Kersten és mtsai. 2004**). A teszt szérum és bronchoalveoláris lavage (BAL) mintákon lett optimalizálva, de más testfolyadékokon (gerincvelői folyadék, plazma, vizelet) is sikerrel alkalmazzák (**White és mtsai. 2013; Chong és mtsai. 2016a; Reischies és mtsai. 2016**). A forgalmazó által javasolt

pozitív határérték a 0,5-ös optikai denzitás, de mivel BAL minták esetében gyakran tapasztaltak magas álpozitivitást, így az EORTC/MSG csoport ajánlása alapján ilyen jellegű mintákon az 1.0-es abszorbancia feletti érték tekinthető pozitívnak. Mindemellett a módszer érzékenysége és a pozitív határérték függ a fotometriás készülék típusától (**De Pauw és mtsai. 2008; Maschmeyer és mtsai. 2015**).

Bronchoalveoláris lavage folyadékból még azelőtt diagnosztizálható a fertőzés, mielőtt a tüdőaszpergillózisra utaló elváltozások megjelenének a CT felvételen, ellenben GM a vérkeringésben feltehetően csak az angioinvaszív szakaszban mutatható ki, vagyis miután az *Aspergillus* hifák az alveoláris kapillárisokon áthatolnak (**Hope és mtsai. 2007; Zhuang és mtsai. 2017**).

A béta-laktám antibiotikus kezelés növelheti a vér GM szintjét, melynek következtében ugyancsak álpozitív eredményekről számoltak be (**Aubry és mtsai. 2006; Pfeiffer és mtsai. 2006**).

#### 3.2.3.1.2 *Lateral Flow teszt*

Invazív aszpergillózis során GM antigének a vizeletbe is kiválasztódnak, melyek JF5-746 monoklonális antitesttel kimutathatók. Ez a módszer a terhességi tesztek mintájára készült, 15 perces inkubációt követően az eredmény a kapott sávintenzitásokból leolvasható, amely lehet negatív (-), pozitív (+) vagy erősen pozitív (++) . A módszer legnagyobb előnye, hogy non-invazív módon szinte azonnal diagnosztizálható a beteg, ellenben nincs lehetőség fajmeghatározásra, valamint a módszer keresztreakál *Penicillium* fajokkal (**Heldt és Hoenigl 2017**).

#### 3.2.3.1.3 *Az 1-3-β-D-glükán pántfungális biomarker*

Az 1-3-β-D-glükán (BG) számos gombában megtalálható sejtfalalkotó, ezért még nemzetség szinten sem képes diszkriminálni a gombák között. A teszt nem specifikusan mutatja ki az *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichosporon* vagy *Pneumocystis jirovecii* eredetű fertőzéseket. Jelentősen eltérő szenzitivitást állapítottak meg egyes *Candida* fajoknál (*Candida albicans*: 72%-os szenzitivitás, *Candida parapsilosis*: 41%-os szenzitivitás), illetve a korábban candidémiával kezelt betegek esetében gyakori az álpozitivitás (**Naselli és mtsai. 2015**). Egyes baktériumokkal, mint a *Streptococcus pneumoniae*, és *Pseudomonas aeruginosa* keresztreakció tapasztalható (**Lehrnbecher és mtsai. 2018**). Bizonyos esetekben egészséges embereknél is emelkedett BG szintet tapasztaltak (**Oz és Kiraz 2011**), ugyanakkor a piperacillin-tazobaktám



antibiotikus kezelés is emelheti a vér BG szintjét (**Koltze és mtsai. 2015**). Mindemellett egészséges gyermekek BG szintje magasabb, mint a felnőtteké, ezért az invazív candidiázis pozitív határértékét 125 pg/ml-ben határozták meg a felnőttek esetén érvényes 80 pg/ml helyett (**Goudjil és mtsai. 2013**).

### 3.2.3.2 Nukleinsav alapú molekuláris diagnosztikai módszerek

Az átfedő telepmorfológiai jegyek miatt a pontos fajazonosítás tenyésztéssel sok esetben nem lehetséges, az eredményeket ilyen esetekben fajkompleként közlik, ami az egyes taxonómiai szekciókon belüli közeli rokon fajokat foglalja magába (**Powers-Fletcher és Hanson 2016; Wickes és Wiederhold 2018**). Emiatt a fajmeghatározáshoz gyakran szükséges valamilyen kiegészítő molekuláris diagnosztikai teszt elvégzése. Hivatalosan a gombák génszekvencia alapú azonosítására a riboszómális RNS gének „*internal transcribed spacer*” (*ITS*) régióit, az *ITS-1*, *5.8S* és *ITS-2* szakaszokat használják (**Schoch és mtsai. 2012**). Bizonyos közeli rokonfajok esetében azonban nem található meg az *ITS* szekvenciákban olyan mértékű diverzitás, ami lehetővé tenné az elkülönítésüket. Emiatt az „International Society for Human and Animal Mycology” (ISHAM) szervezet a fajkomplekx meghatározásához az *ITS* régiókat, míg azokon belüli pontos fajazonosításhoz a fehérje kódoló, részben konzervált lókuszosokat ( *$\beta$ -tubulin*, *kalmodulin*) javasolja (**Raja és mtsai. 2017**). A kombinált diagnosztika hatékonyságát több tanulmány is igazolta, különösen a PCR diagnosztikai módszerek, és a GM szerológiai tesztek esetében (**Aguado és mtsai. 2015; Paholcsek és mtsai. 2015; Loeffler és mtsai. 2017**).

Az elmúlt évtizedek során a kutatólaboratóriumok számos fajalapú gombadiagnosztikai PCR tesztet fejlesztettek ki világszerte. A nagyfokú heterogenitásból kifolyólag jelenleg is nagy kihívás ezen a területen a standardizálás, és nincs egyezményes irányelv a mintatípus, kiindulási mintatérfogó, DNS izoláló módszer, PCR készülék típusa, illetve a gomba kimutatásához használt PCR esszék tekintetében (**Moazeni és mtsai. 2013**). Bár számos kereskedelmi forgalomban lévő PCR teszt létezik a kiemelt fontosságú gombafajok kimutatására, ezek közül egy sem kapott „Food and Drug Administration” (FDA) minősítést az Egyesült Államokban (**Powers-Fletcher és Hanson 2016**).

További probléma, hogy a környezeti kontaminációra visszavezethető álpozitív eredmények gyakoriak, mivel ezek szenzitív módszerek, így már nagyon kis mennyiségű DNS szennyezést is kimutatnak (**Zarrinfar és mtsai. 2013**). A terápiás szerek magas költsége és súlyos mellékhatásai

miatt az álpozitív eredmények komoly következményeket vonhatnak maguk után (**Harrison és mtsai. 2010**). Az adekvát diagnózishoz szükséges ugyanakkor PCR reakció inhibíciós kontrollok beiktatása is, különösen vérmintáknál, amelyek esetén a hemoglobin és az immunglobulin G a két fő komponens, melyek a polimeráz enzim aktivitásának csökkentésével vagy a fluoreszcens jel kioltása révén gátolhatják a PCR reakciót (**Sidstedt és mtsai. 2018**). **Czurda és mtsai. (2016)** igazolták, hogy számos kereskedelmi forgalomban lévő PCR reagens gyakran szennyezett valamilyen gomba DNS-el. Hasonlókat írtak le liofilizált oligonukleotidok esetén is. Ezek a pántfungális DNS markereken alapuló PCR esszék esetében különösen nagy gondot okoznak, és a módszer megbízhatóságát jelentősen csökkentik.

#### 3.2.3.2.1 Kereskedelmi forgalomban hozzáférhető PCR gombadiagnosztikai tesztek

A kereskedelmi forgalomban kapható PCR tesztek a szenzitivitásuk, reakcióterfogatuk, az alkalmazott PCR platformok és az azonosított fajok szempontjából nagyon sokfélék lehetnek. Bizonyos tesztek alkalmasak antimikotikum rezisztencia vizsgálatára is. A legtöbb ilyen módszer szekvenciaspecifikus fluoreszcensen jelölt próbákat alkalmaz, amelyek nem átfedő hullámhosszokon emittáló fluoreszcens festékekkel teszik lehetővé több gombafaj egyidejű azonosítását. A többszörös jelölés a tesztek költségét megnöveli. A legelterjedtebb gomba diagnosztikai PCR tesztek a következők:

- A MycAssay Aspergillus<sup>®</sup> (Microgen Bioproducts Ltd., Camberley, Egyesült Királyság) 18S riboszómális RNS génre specifikus hibridizációs próbákkal az *Aspergillus*okat nemzetség szinten képes kimutatni. A módszer érzékenysége kevesebb, mint 50 génekópia (**Guinea és mtsai. 2013**).
- Az AsperGenius<sup>®</sup> multiplex esszé, a 28S riboszómális RNS gén alapján mutatja ki az *Aspergillus fumigatus* és az *A. terreus*, illetve az *Aspergillus* nemzetséget. A módszer alkalmas az *A. fumigatus* *Cyp51A* génben négy azol rezisztencia marker (L98H, TR34, T289A, Y121F) azonosítására (**Chong és mtsai. 2016b**).
- A MycoGenie<sup>®</sup> PCR esszé (AdemTech Pessac, Franciaország), az AsperGenius-hoz hasonlóan főként szérum mintákból 28S riboszómális RNS-t kódoló génrégiót célozva azonosítja az *A. fumigatus* fajkomplexet, illetve egy azol rezisztenciáért felelős mutációt (TR34/L98H) a *Cyp51A* génben (**Dannaoui és mtsai. 2017**).

- A SeptiFast<sup>®</sup> multiplex PCR szepszis kit (Roche, Rotkreuz, Svájc), amely teljes vérből patogén baktériumok és gombák széles körét detektálja. Számos *Candida* faj (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*) mellett kimutatja az *Aspergillus fumigatus*-t (Dark és mtsai. 2012).

#### 3.2.3.2.2 Nagyfelbontású olvadási görbe analízis

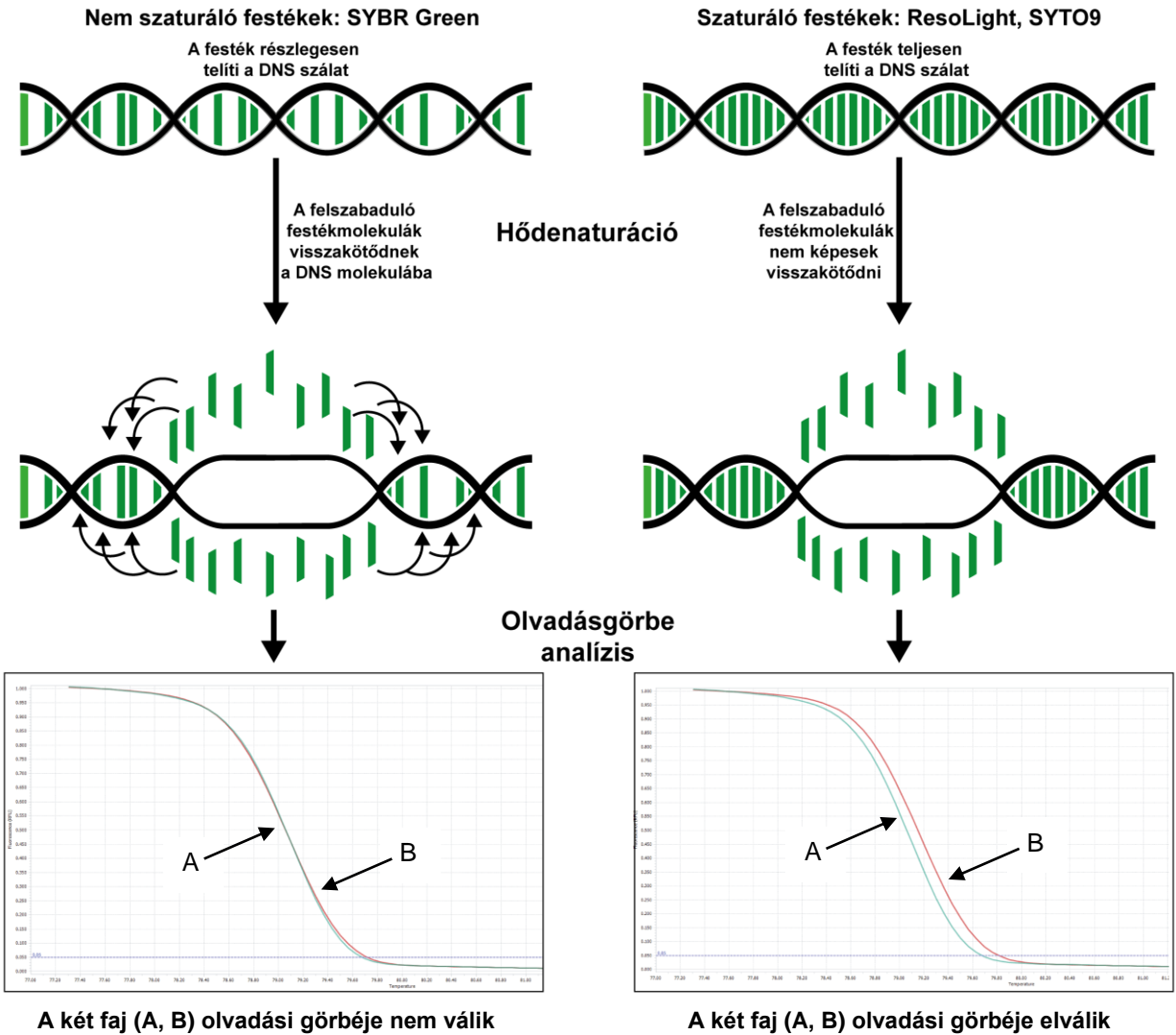
A nagyfelbontású olvadási görbe analízis (HRM) poszt-PCR alkalmazást eredetileg genetikai variánsok érzékeny elkülönítésére fejlesztették ki. A módszer 2002 óta ismert, és azóta számos klinikai területen alkalmazzák (Tamburro és Ripabelli 2017). Gyorsan és könnyen kivitelezhető, költséghatékony, az analízis közvetlenül az amplifikációt követően zárt csőben elvégezhető, és szemben az új-generációs szekvenáláson alapuló módszerekkel, a genetikai eltérések az ampliconok pontos szekvenciájának ismerete nélkül kimutathatók. Ideális alternatíva lehet olyan klinikai felhasználások esetén, ahol az idő kulcsfontosságú tényező. A diagnosztikai laboratóriumokban rutinszerűen végzik daganatok mutáció térképezését ezen módszerekkel, de széles körben alkalmazhatóak patogén mikroorganizmusok genetikai azonosítására, különböző gyógyszerrezisztenciához köthető génmutációk kimutatására, élelmiszervizsgálatokhoz, és növényváltozatok meghatározásához (Tong és Giffard 2012; Druml és Cichna-Markl 2014; Simok 2016).

A HRM során a reakcióközeget az ampliconok duplex állapotától a teljes denaturációs hőmérsékletig melegítve, a szálak szétválásával a duplaszálú DNS interkaláló festék felszabadul. Ez a fluoreszcencia intenzitás csökkenését eredményezi, amelynek a folyamatos mérésével egy olvadási görbe írható le, amelyből az ampliconok olvadási hőmérséklete (vagyis az a hőmérsékleti pont, amelynél a DNS molekulák fele van duplaszálú állapotban) meghatározható (Erali és mtsai. 2008). A PCR termékek hődenaturációja során általában először egy mérsékelt fluoreszcencia szint csökkenés figyelhető meg, majd az olvadási hőmérséklet környékén hirtelen esés tapasztalható, végezetül az olvadási hőmérsékletet átlépve, az ampliconok teljes denaturációja következtében a fluoreszcencia jelintenzitás a nullához közelít. Az olvadási görbék lefutásából, a fluoreszcencia intenzitás csökkenés és a hőmérséklet viszonya alapján ( $-\Delta F/\Delta T$ ) meghatározható az ampliconokra jellemző olvadási csúcs (Ruskova és Raclavsky 2011).

Az olvadási hőmérsékletet elsősorban az amplikonok hossza és a GC bázisok aránya befolyásolja. A DNS kettős szálban a GC bázisok három, az AT bázisok pedig két hidrogénkötést létesítenek egymással, ezért eltérő termikus energia szükséges a kötések felbontásához. Mindezek alapján az olvadási görbék alakja és az olvadási hőmérsékletek alkalmasak lehetnek különböző mikroorganizmusok genetikai ujjlenyomatainak meghatározására. Azok a duplexek amelyek GC tartalma 0% átlagosan 41 °C-al alacsonyabb olvadási hőmérséklettel rendelkeznek, mint a 100% GC tartalmú amplikonok. Rövidebb amplikonokra jellemzően egy olvadási domén, és az ahhoz tartozó egy olvadási csúcs figyelhető meg, míg hosszabb PCR termékek komplexebb olvadási mintázattal és több olvadási csúccsal rendelkeznek.

Az alkalmazott dupla szálú DNS-be kötődő festék mennyisége és a denaturációs hőmérséklet emelésének dinamikája egyaránt hatással vannak az olvadási görbe lefutására. Az olvadási reakció során a hőmérséklet kis léptékű emelésével jobb felbontás érhető el (**Ririe és mtsai. 1997**). Bizonyított, hogy azonos gyártótól származó különböző PCR típusmodellek esetén is szignifikáns különbségek tapasztalhatók az olvadási görbékben, annak ellenére, hogy a beállított olvadási program megegyezett. Ez feltételezhetően a műszerek közti technológiai eltérések miatt lehetséges (**Herrmann és mtsai. 2007**).

A HRM PCR reakciók során harmadik generációs, úgynevezett szaturáló fluoreszcens festéket használnak, mint például a ResoLight, SYTO9 vagy LCGreen (**Li és mtsai. 2010**). Ezek a festékek nagy koncentrációban alkalmazhatók, így teljes szaturáció érhető el, ezért használatukkal a HRM reakció során felszabaduló festékmolekulák nem képesek visszakötődni a még nem denaturálódott DNS szakaszokba (**4. ábra**). Ez pontosabb olvadási görbe meghatározást tesz lehetővé, mint a nem szaturáló festékek használata. Továbbá a szaturáló festékek a magas koncentráció ellenére sem befolyásolják a PCR reakció hatékonyságát, stabilabbak, így erősebb jelintenzitás érhető el, mint a nem szaturáló festékek (SYBR™ Green) esetében, amelyeket a konvencionális olvadáspont analízishez használnak (**Wittwer és mtsai. 2003**).



**4. ábra: A nem szaturáló- és szaturáló festékek közti különbség.** A szaturáló festékek nagy koncentrációban alkalmazhatók, ezért teljesen telítik a DNS szálát, így az olvadásgörbe analízis során végbemenő denaturáció következtében felszabaduló festékmolekulák nem kötődnek vissza a DNS kettős szálba. Ez jobb felbontóképességet biztosít, mint a nem szaturáló festékek alkalmazása.

A HRM-PCR alapú diagnosztikai módszerek könnyen kivitelezhetők, de az esszék optimalizálása nagy körültekintést igényel, mivel az olvadási görbék kinetikáját számos paraméter befolyásolja. **Slomka és mtsai. (2017)** összegezték azokat a nehézségeket, amelyek ronthatják az analízis minőségét, és a módszer megbízhatóságát:

- 1. Sejtfeltárás:** A feltárás hatékonyságát illetően jelentős különbségek figyelhetők meg a sejtfeltáró módszerek között. A gombák vastag sejtfalának megbontására a kerámia gyöngy alapú mechanikai sejtfeltáró módszereket tartják a leghatékonyabbnak (**Klimek-Ochab és mtsai. 2011**).
- 2. A DNS izolálás:** Az extrakciós protokoll jelentős hatással van a kinyert DNS extraktum minőségére és mennyiségére. A fenol-kloroform-izoamilalkoholos (25:24:1) DNS precipitáción alapuló módszerrel szemben a kereskedelmi forgalomban lévő szilika membrános vagy mágnesgyöngyös izoláláson alapuló kiteknek alacsonyabb a DNS kihozataluk, de jobb minőségű nukleinsav nyerhető ki, csökkentve a PCR inhibíció kockázatát.
- 3. Az izolált DNS tisztasága és mennyisége:** Az inhibitorok jelenléte a mintában, mint például különböző sók (NaCl, KCl), fehérjék vagy detergensok (SDS, etanol, izopropanol) egyaránt rontják az amplifikációs hatékonyságot. Egyrészt kötődésük az egyszálú vagy duplaszálú DNS-hez gátolja a polimeráz enzim kötődését a templáthoz, valamint a festékmolekulák beépülését a DNS kettős szálba. Továbbá ezek az anyagok csökkentik a DNS polimeráz aktivitását azáltal, hogy a szükséges kofaktorok (például  $Mg^{2+}$ ) kötődését megakadályozzák. Az inhibíció az olvadási analízis során az eltérő szekvenciával rendelkező ampliconok esetében is átfedő olvadási görbéket eredményezhet, és torzulhatnak olvadási csúcsok is. Bizonyos esetekben inhibitorok előfordulhatnak a DNS molekulához kötötten is, amelyek csak a PCR reakció denaturációs szakaszában szabadulnak fel, ezért elengedhetetlen az exogén inhibíciós kontrollok beiktatása. Extrém magas DNS templát mennyiség ugyancsak csökkenti az amplifikációs hatékonyságot azáltal, hogy elvonja a magnézium ionokat a reakcióközögből, csökkentvén a polimeráz enzim aktivitását.
- 4. Az ampliconok hossza, primerek specifikussága:** Rövidebb ampliconok esetén jobb felbontóképesség érhető el a HRM analízis során, ezért a primereket általában a diverz szekvenciájú génrégiók közvetlen közelébe tervezik, azonban a primer kötőhelyeken belüli báziseltérések akadályozhatják a primerek betapadását a célszekvenciához (**Słomka és mtsai. 2017**).
- 5. A PCR master mix összetétele ( $MgCl_2$ , primer koncentráció):** A magnézium ionok szükségesek a DNS polimeráz enzim megfelelő működéséhez, így azok mennyisége a

reakcióközegben hatással van az enzim aktivitására. Mindemellett a magnézium ionok befolyásolják az amplikonok olvadási hőmérsékletét. A HRM analízishez általában 0,5-3 mM MgCl<sub>2</sub> koncentráció tartomány alkalmazása ajánlott. Túl magas MgCl<sub>2</sub> koncentráció csökkenti a PCR reakció specificitását, míg túl alacsony koncentráció esetén csak kis mennyiségben vagy egyáltalán nem képződik PCR termék (**Schmidt és mtsai. 2014**). Az optimális primer koncentráció tartománya általában 0,1-1 µM közötti. Túl magas primer mennyiség primer-dimer képződéshez vezethet, ami rontja az anellációs hőmérséklet hatékonyságát, és megnöveli az aspecificus PCR termékképződés esélye. Rövid amplikonok esetén azonban indokolt a magasabb primer koncentráció az amplifikációs hatékonyság növelése érdekében (**Debode és mtsai. 2017**).

- 6. Anellációs hőmérséklet:** A primerek olvadási hőmérsékletét az oligonukleotidok hossza és GC aránya befolyásolja. Hosszabb és magas GC tartalmú primerek magasabb anellációs hőmérséklettel rendelkeznek. Amennyiben túl magas az anellációs hőmérséklet, úgy a primerek nem képesek betapadni, ellenben túl alacsony anelláció mellett aspecificus termékképződés tapasztalható. Az optimális anellációs hőmérséklet meghatározását általában gradiens PCR programmal végzik.

A szakirodalomban leírt HRM esszék többnyire az „*internal transcribed spacer*” (*ITS1*, *ITS2*) vagy az *ITS1-5.8S-ITS2* gén régiókat alkalmazzák a fajmeghatározáshoz (**Didehdar és mtsai. 2016; Xanthopoulou és mtsai. 2018**). **Duyvejonck** és mtsai. a különböző *Candida* fajok azonosítására kifejlesztett *ITS2* géntargeten alapuló HRM PCR módszerük diagnosztikai hatékonyságát hasonlították össze a tenyésztésen alapuló MALDI-TOF tömegspektrometriás fajazonosítással. Arra a megállapításra jutottak, hogy a HRM PCR módszerek szenzitivitása megfelelő lehet a patogének direkt kimutatására különböző biológiai mintákból, és a nem tenyésztendő kriptikus gombafajok azonosítására, illetve a közeli rokonfajok elkülönítésére. A módszer legnagyobb előnye a gyorsasága, hiszen akár egy napon belül azonosítható a patogén, és a mintában lévő gombasejtek mennyisége a detektálási határ fluoreszcencia intenzitásának átlépéséhez szükséges ciklusszám (C<sub>q</sub>) alapján akár pontosan meghatározható. A szerzők ugyanakkor említik, hogy több kórokozó (kevert jellegű fertőzés) esetén a módszer kevésbé megbízható, mivel a primerek eltérő affinitással kötődnek a különböző *Candida* célszekvenciákhoz.

### 3.2.3.2.3 Új-generációs szekvenáláson alapuló diagnosztikai módszerek

Az új-generációs szekvenáláson alapuló módszerek alkalmasak a különböző mikrobák faji szintű meghatározására a rájuk jellemző szekvenciák alapján, és emellett különböző komplex vizsgálatok elvégzésére. Akadnak, akik úgy gondolják, hogy a jövőben ez a technológia lehet az új molekuláris „gold standard” a gombadiagnosztikában (**Summerbell és mtsai. 2005**). Fajmeghatározásra legelterjedtebben a célzott amplikon szekvenálást alkalmazzák, melynek során a célgént PCR módszerrel felszorzozzák, majd azok pontos szekvenciáját meghatározzák, és a szekvencia olvasatokat egy referencia adatbázishoz illesztve meghatározzák a százalékos homológiát (**Balajee és mtsai. 2009**). Célszekvenciaként többnyire a gombák kis- és nagy riboszómális RNS-eket kódoló régiók között elhelyezkedő *ITS1* és *ITS2*, illetve a *18S* riboszómális RNS-t kódoló géneket használják (**Hibbett és mtsai. 2011; Zoll és mtsai. 2016; Wagner és mtsai. 2018**). A szekvenciaillesztéshez használt referencia adatbázis lefedettsége és minősége jelentősen befolyásolja a fajmeghatározás sikerességét (**Gdanetz és mtsai. 2017**), emiatt 2003-ban megalkották a UNITE elnevezésű *ITS* szekvenciákat összegyűjtő adatbázist (**Köljalg és mtsai. 2013**).

A teljes genom szekvenálás révén lehetőség nyílik a betegből izolált klinikai gombatorzsek teljes rezisztencia profiljának feltérképezésére, amelyre csak számos rezisztencia marker specifikus PCR esszé kivitelezésével lenne mód (**Biswas és mtsai. 2017**). Továbbá a módszerrel olyan új hibrid törzsek azonosítása is lehetséges, amelyeket a konvencionális módszerek általában nem képesek elkülöníteni (**Schröder és mtsai. 2016**). Habár a gombák csekély százalékban vannak jelen a humán holobiomban, ugyanakkor fontos szerepet töltenek be a kommunák közti egyensúly megtartásában (**Botschuijver és mtsai. 2017**). Az immunszupprimált betegekben a mikrobiom előnytelen megváltozása opportunistá gombafertőzések kialakulásához vezethet (**Zoll és mtsai. 2016**). Az új-generációs szekvenáláson alapuló metagenomikai vizsgálatok lehetővé teszik a komplex mikroba kommunák összetételének feltérképezését (**Caporaso és mtsai. 2010; Cuomo 2017**). Annak ellenére, hogy az elmúlt évtizedben a szekvenálás költsége jelentősen csökkent, rutin diagnosztikai alkalmazásuk még mindig csak a nagyobb egészségügyi központokban megoldott (**Weymann és mtsai. 2017**).



### 3.2.3.3 Tömegspektrometria a klinikai mikológiában

A mátrix-asszisztált lézer deszorpciós ionizáció (MALDI) repülési idő (TOF) mérésen alapuló tömegspektrometriai (MS) vizsgálat lehetővé teszi a gombatenyészetek pontos faji szintű azonosítását a mikrobiológiai laboratóriumok számára. A MALDI során a mintát valamilyen organikus mátrixba (alfa-ciano-4-hidroxi-fahéjsav, dihidroxi-benzoésav) ágyazzák, amely az ionizáló lézer (nitrogén lézer) energiáját képes átadni az analit molekuláinak, amelyek ezt követően a deszorpció során a mátrixszal komplexet képezve felszabadulnak, és nagyvákuumban gyorsítófeszültség hatására az analizátorba kerülnek. Az analizátorban az eltérő méretű vegyületek a töltéssűrűségekre eső tömegük ( $m/z$ ) alapján szétválasztódnak, és a vákuumcsövön keresztül haladva a detektorba repülnek (Nagy és mtsai. 2014). A repülési idő egyenesen arányos a molekula méretével. Bizonyos esetekben lehetőség van több MS készülék tandem alkalmazására, vagy reflexiós tükrök használatára, amelyek megnövelik a repülési út hosszát, és jobb felbontóképességet biztosítanak. A detektoregységéből érkező jelet ezt követően normalizálják, amely során a mintákból eredő jelintenzitásokat számítógépes algoritmusok segítségével elválasztják a háttér jelinterferenciáktól, majd a mikroorganizmust fehérjespektrum alapján faji vagy nemzetség szinten azonosítják (Coombes és mtsai. 2007). A módszer alkalmas olyan közeli rokon gombafajok elkülönítésére (például *Candida parapsilosis* komplex tagjai), amelyek morfológiai jegyek alapján identikusak (Hof és mtsai. 2012; De Carolis és mtsai. 2014). A klinikai mikológiában jelenleg négy készülék alkalmazható rutin diagnosztikára: Andromas (Andromas SAS, Párizs, Franciaország), MALDI Biotyper (Bruker Daltonics GmbH, Bréma, Németország), Axima@Samaris (Shimadzu/AnagnosTec, Duisburg, Németország), Vitek MS (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Franciaország) (Cassagne és mtsai. 2016). Baktériumok esetében lehetőség van közvetlen felvitelre, de gombák komplex és ellenálló sejtfala miatt a mintafelvétel előtt szükséges protein extrakciós módszer alkalmazása. Fonális gombák esetében a tenyészet kora, és a táptalaj típusa egyaránt befolyásolja a vizsgálat során kapott fehérjespektrumot (Cassagne és mtsai. 2013).

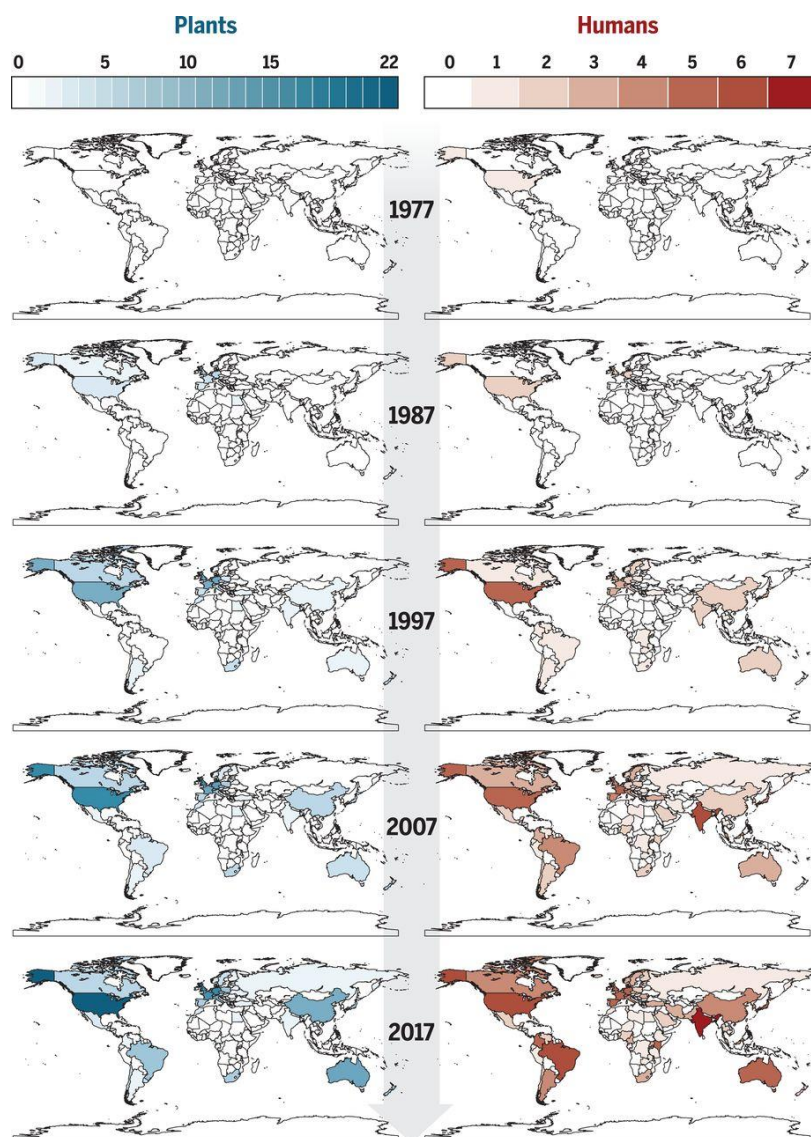
### 3.3 Terápiás stratégiák és antifungális rezisztencia

Az ESCMID-ECMM-ERS (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases-European Confederation of Medical Mycology-European Respiratory Society) nemzetközi konzorcium 2017-es közleménye szerint, a onkohematológiai betegek invazív aszpergillózis gyanúja esetén alkalmazandó terápiás stratégiák (amelyek kiterjeszthetők más szisztémás gombafertőzésekre is) a következők:

1. **Elsődleges prophylaxis:** A rizikócsoportha tartozó betegnél megkezdik a megelőző antifungális terápiát, kiváltképp, ha a neutropéniás láz megjelenik.
2. **Empirikus stratégia:** Neutropéniás láz megjelenésekor széles spektrumú antibiotikumok kezelésben részesül a beteg. Amennyiben a kezelés hatására a neutropéniás láz nem szűnik, úgy a kezelést antifungális terápiával egészítik ki. Ez a megközelítés csökkentheti a morbiditást és mortalitást.
3. **Pre-emptív stratégia:** Amennyiben a gombafertőzés meglétét valamely diagnosztikai módszerrel (GM-ELISA vagy PCR) sikerül igazolni, megkezdik a terápiát. A GM-ELISA helyett használható 1-3- $\beta$ -D-glükán teszt, de ez utóbbi nem *Aspergillus* specifikus.
4. **Másodlagos prophylaxis:** Az előzetesen invazív aszpergillózissal diagnosztizált és sikeresen kezelt betegeken preventív jelleggel antifungális kezelést alkalmaznak az ismételt immunszuppresszáció kritikus fázisaiban, amikor fennállhat az újra fertőződés kockázata (például allogén őssejt-transzplantációt követő felépülés korai szakaszában, vagy ha kemoterápia alatt megjelenik a neutropéniás láz).

### 3.3.1 A fajalapú diagnózis és célzott terápia jelentősége

A gyógyszerrezisztencia egyre súlyosbodó globális probléma (5. ábra). A gombák kétféle rezisztenciával rendelkezhetnek: a) elsődleges rezisztencia, mikor a gomba természetes ellenálló képességgel rendelkezik az adott gyógyszertípussal szemben, b) szerzett rezisztencia, mikor hosszú expozíciót követően másodlagos rezisztencia mechanizmusok (génexpresszió és bioszintetikus útvonalak megváltozása, horizontális géntranszfer) által alakít ki rezisztenciát (Perlin és mtsai. 2017).



**5. ábra: Azol rezisztens gombatörzsek előfordulásának időrendbeli változása világszerte.** A kék színskála az azol-rezisztens növényfertőzéseket leíró publikációk számára utal, míg a piros színskála az azol-rezisztens *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. auris*, *C. glabrata* humán gombapatogénekről szóló egészségügyi jelentések számát mutatja. (forrás: Fisher és mtsai. 2018)

A *Candida krusei* fluconazol, az *Aspergillus terreus* pedig amphotericin B elleni elsődleges rezisztenciával rendelkezik (Arendrup 2014). Szerzett rezisztencia a gombákra gyakorolt szelekciós nyomás következménye. Ehhez hozzájárult, hogy a jelenleg engedélyezett antifungális szerek közül az amphotericin B-t humán gyógyászatban már az 1950-es évektől kezdve használják gombafertőzések kezelésére (Hokken és mtsai. 2019). Az elsődleges profilaxis szintén növeli a rezisztencia kialakulásának esélyét. Emellett a mezőgazdaságban alkalmazott fungicid vegyszerek gyakran azonosak a humángyógyászatban használtakkal, ez jelentősen növelte például a környezetben előforduló azol rezisztens gombák számát az elmúlt évtizedekben (Perlin és mtsai. 2017; Berger és mtsai. 2017). A multidrog rezisztens gombatörzsek, mint például a *Candida auris* vagy *Candida glabrata* kezelése nagy kihívást jelent a klinikusok számára (Healey és mtsai. 2016; Forsberg és mtsai. 2019). A humángyógyászatban alkalmazott antifungális gyógyszereknek négy fő típusa ismert (echinocandinok, azolok, poliének, pirimidin analógok) amelyeket az 1. táblázat összegzi (Roilides és Iosifidis 2019).

**1. táblázat: Gombainfekciók kezelésére leggyakrabban használt gyógyszerek**

Gyógyszercsoport	Antifungális szer neve	Hatásmechanizmus	Rezisztencia mechanizmus	Leírt rezisztens fajok
Poliének	Amphotericin B Nystatin Natamycin	sejtmembrán alteráció az ergosterol megkötésével	• Mutáció az <i>ERG3</i> génben, amely csökkent membrán ergosterol tartalmat eredményez	<b>Aspergillus spp.</b>
				<i>A. terreus</i> <i>A. flavus</i> <i>A. nidulans</i>
Azolok	Fluconazol Posaconazol Voriconazol	citokóm P450 14 $\alpha$ -lanosterol demetiláz enzim gátlása az ergosterol bioszintetikus útvonalban	• Mutáció az <i>ERG11</i> génben, vagy a gén túlexpresszállása • Fokozott ABC transzporter aktiváció amely csökkenti az azol felvételt	<b>Candida spp.</b>
				<i>C. lusitaniae</i> <i>C. auris</i>
Echinocandinok	Caspofungin Micafungin Anidulafungin	$\beta$ (1,3)-glükán szintáz Fks1p vagy Fks2p gátlása a sejtfa bioszintézisben	• Mutáció az <i>FKS1</i> és <i>FKS2</i> génekben	<b>Aspergillus spp.</b>
				<i>A. fumigatus</i> <i>A. terreus</i> <i>A. flavus</i> <i>A. nidulans</i>
Pirimidin analóg	Flucitozin	DNS/RNS szintézis gátlása	• Enzimdefektusok az 5-FC metabolikus útvonalban (mutáció az <i>FCA1</i> , <i>FUR1</i> , <i>FCY21</i> , <i>FCY22</i> génekben)	<b>Candida spp.</b>
				<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. lusitaniae</i>

## 4. Célkitűzés

Alapvető célunk olyan nagyfelbontású olvadási görbe analízisen alapuló nukleinsav gombadiagnosztikai PCR esszék beállítása volt, amelyek alkalmasak az *Aspergillus* és *Candida* nemzetségekhez tartozó számos klinikai jelentőségű fontos gombafaj azonosítására.

A téma felvetéséhez kapcsolódóan az alábbi célokat tűztük ki:

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

## 5. Anyagok és módszerek

### 5.1 Referencia törzsek és klinikai izolátumok

A módszerek optimalizálása során összesen 104 db gomba- és 16 db baktériumtörzset vizsgáltunk (2. táblázat). A klinikai izolátumok a szegei (SZMC) és a debreceni (DMC) mikrobiológiai gyűjteményekből, a referencia törzsek pedig különböző nemzetközi mikrobiológiai gyűjteményekből származnak: Fungal Genetics Stock Center (FGS); Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal and Yeast Collection (CBS); Northern Regional Research Laboratories (NRRL); American Type Culture Collection (ATCC). A penészgombák közül összesen 43 *Aspergillus* klinikai izolátumot, és 6 db *Aspergillus* referencia törzset, az élesztőgombák esetében pedig 38 db *Candida* klinikai izolátumot és 5 db *Candida* referencia törzset teszteltünk. Keresztreakciókat vizsgáltunk más, klinikumban ugyancsak előforduló *Fusarium*, *Scedosporium*, *Lichtemia*, *Rhizopus* gombafajokkal, illetve különböző Gram-pozitív (*Staphylococcus*, *Enterococcus*) és Gram-negatív (*Enterobacter*) baktériumokkal.

#### 2. táblázat: Alkalmazott referencia törzsek és klinikai izolátumok

Mintaazonosító	Törzsszám	Mikroorganizmus	Eredet
<b>Penészgombák</b>			
<b><i>Aspergillus</i> nemzetség</b>			
<b>Referencia</b>	<b>FGSC A1156</b>	<b><i>Aspergillus terreus</i></b>	<b>-</b>
1	SZMC 2414	<i>Aspergillus terreus</i>	India
2	SZMC 2424	<i>Aspergillus terreus</i>	India
3	SZMC 2460	<i>Aspergillus terreus</i>	India
4	SZMC 22546	<i>Aspergillus terreus</i>	India
5	SZMC 22547	<i>Aspergillus terreus</i>	India
6	SZMC 22548	<i>Aspergillus terreus</i>	India
7	SZMC 22549	<i>Aspergillus terreus</i>	India
<b>Referencia</b>	<b>CBS 101355/AF 293</b>	<b><i>Aspergillus fumigatus</i></b>	<b>-</b>
8	SZMC 2504	<i>Aspergillus fumigatus</i>	India
9	SZMC 2490	<i>Aspergillus fumigatus</i>	India
10	SZMC 2486	<i>Aspergillus fumigatus</i>	India
11	SZMC 22550	<i>Aspergillus fumigatus</i>	India
12	SZMC 22551	<i>Aspergillus fumigatus</i>	India
13	SZMC 22552	<i>Aspergillus fumigatus</i>	India
14	SZMC 22553	<i>Aspergillus fumigatus</i>	India
15	SZMC 22554	<i>Aspergillus fumigatus</i>	India
16	SZMC 3111	<i>Aspergillus fumigatus</i>	India
17	SZMC 3109	<i>Aspergillus fumigatus</i>	India
18	SZMC 3100	<i>Aspergillus fumigatus</i>	India

19	SZMC 3117	<i>Aspergillus fumigatus</i>	India
20	SZMC 3106	<i>Aspergillus fumigatus</i>	India
21	SZMC 3104	<i>Aspergillus fumigatus</i>	India
<b>Referencia</b>	<b>CBS 117885</b>	<b><i>Aspergillus lentulus</i></b>	<b>-</b>
22	SZMC 3118	<i>Aspergillus lentulus</i>	India
23	SZMC 3123	<i>Aspergillus lentulus</i>	India
24	SZMC 20911	<i>Aspergillus lentulus</i>	Magyarország
<b>Referencia</b>	<b>NRRL 11611</b>	<b><i>Aspergillus flavus</i></b>	<b>-</b>
25	SZMC 22583	<i>Aspergillus flavus</i>	India
26	SZMC 22582	<i>Aspergillus flavus</i>	India
27	SZMC 22581	<i>Aspergillus flavus</i>	India
28	SZMC 22580	<i>Aspergillus flavus</i>	India
29	SZMC 22579	<i>Aspergillus flavus</i>	India
30	SZMC 22578	<i>Aspergillus flavus</i>	India
31	SZMC 22577	<i>Aspergillus flavus</i>	India
32	SZMC 22575	<i>Aspergillus flavus</i>	-
<b>Referencia</b>	<b>CBS 113.46</b>	<b><i>Aspergillus niger</i></b>	<b>-</b>
33	SZMC 3119	<i>Aspergillus niger</i>	India / keratitis
34	SZMC 3108	<i>Aspergillus niger</i>	India / keratitis
35	SZMC 2402	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	Magyarország
36	SZMC 23407	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	Magyarország
37	SZMC 23406	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	Magyarország
38	SZMC 23408	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	-
<b>Referencia</b>	<b>CBS 134.48</b>	<b><i>Aspergillus tubingensis</i></b>	<b>-</b>
39	SZMC 2758	<i>Aspergillus tubingensis</i>	Magyarország
40	SZMC 3127	<i>Aspergillus tubingensis</i>	Hollandia
41	SZMC 2040	<i>Aspergillus udagawae</i>	környezeti
42	SZMC 2041	<i>Aspergillus udagawae</i>	környezeti
43	SZMC 21694	<i>Aspergillus viridinutans</i>	környezeti
<b><i>Fusarium</i> nemzetség</b>			
44	SZMC 13F	<i>Fusarium sacchari</i>	nem ismert
45	SMC 90/11	<i>Fusarium napiforme</i>	nem ismert
46	SZMC 173/11	<i>Fusarium delphinoides</i>	nem ismert
47	SZMC 394/11	<i>Fusarium oxysporum</i>	nem ismert
48	SZMC 11525	<i>Fusarium solani</i>	nem ismert
49	SZMC 11487	<i>Fusarium verticillioides</i>	nem ismert
50	SZMC 11481	<i>Fusarium incarnatum</i>	nem ismert
<b><i>Lichtemia</i> nemzetség</b>			
51	SZMC FSU9682	<i>Lichtemia corymbifera</i>	nem ismert
<b><i>Rhizopus</i> nemzetség</b>			
52	SZMC RH59	<i>Rhizopus oryzae</i>	nem ismert
<b><i>Scedosporium</i> nemzetség</b>			
53	SZMC Sce	<i>Scedosporium aurantiacum</i>	nem ismert
54	CBS 116910 /136046	<i>Scedosporium aurantiacum</i>	nem ismert

<b>Élesztőgombák</b>			
<b><i>Candida</i> nemzetség</b>			
<b>Referencia</b>	<b>ATCC 10231</b>	<b><i>Candida albicans</i></b>	
1	DMC 14134	<i>Candida albicans</i>	nem ismert
2	DMC 3666	<i>Candida albicans</i>	nem ismert
3	DMC 40678	<i>Candida albicans</i>	nem ismert
4	SZMC 22801	<i>Candida albicans</i>	nem ismert
5	SZMC 22800	<i>Candida albicans</i>	nem ismert
6	SZMC 1523	<i>Candida albicans</i>	nem ismert
7	SZMC 1422	<i>Candida albicans</i>	nem ismert
<b>Referencia</b>	<b>ATCC 90030</b>	<b><i>Candida glabrata</i></b>	
8	SZMC 1353	<i>Candida glabrata</i>	nem ismert
9	SZMC 1362	<i>Candida glabrata</i>	nem ismert
10	SZMC 1370	<i>Candida glabrata</i>	nem ismert
11	SZMC 1374	<i>Candida glabrata</i>	nem ismert
<b>Referencia</b>	<b>ATCC 22019</b>	<b><i>Candida parapsilosis</i></b>	
12	DMC 6378	<i>Candida parapsilosis</i>	nem ismert
13	DMC 6403	<i>Candida parapsilosis</i>	nem ismert
14	DMC 16879	<i>Candida parapsilosis</i>	nem ismert
15	SZMC 23640	<i>Candida parapsilosis</i>	nem ismert
16	SZMC 8114	<i>Candida parapsilosis</i>	nem ismert
17	SZMC 1593	<i>Candida parapsilosis</i>	nem ismert
<b>Referencia</b>	<b>ATCC 750</b>	<b><i>Candida tropicalis</i></b>	
18	DMC 10776	<i>Candida tropicalis</i>	nem ismert
19	DMC 2696	<i>Candida tropicalis</i>	nem ismert
20	DMC 3403	<i>Candida tropicalis</i>	nem ismert
21	SZMC 1351	<i>Candida tropicalis</i>	nem ismert
22	SZMC 1364	<i>Candida tropicalis</i>	nem ismert
23	SZMC 1366	<i>Candida tropicalis</i>	nem ismert
24	SZMC 1368	<i>Candida tropicalis</i>	nem ismert
<b>Referencia</b>	<b>ATCC 6258</b>	<b><i>Candida krusei</i></b>	
25	DMC 26513	<i>Candida krusei</i>	nem ismert
26	DMC 23697	<i>Candida krusei</i>	nem ismert
27	DMC 22910	<i>Candida krusei</i>	nem ismert
28	SZMC 1352	<i>Candida krusei</i>	nem ismert
29	SZMC 1414	<i>Candida krusei</i>	nem ismert
30	SZMC 1447	<i>Candida krusei</i>	nem ismert
31	SZMC 1450	<i>Candida guilliermondii</i>	nem ismert
32	SZMC 0808	<i>Candida guilliermondii</i>	nem ismert
33	SZMC 1536	<i>Candida guilliermondii</i>	nem ismert
34	SZMC 1357	<i>Candida guilliermondii</i>	nem ismert
35	SZMC 1469	<i>Candida dubliniensis</i>	nem ismert



36	SZMC 1470	<i>Candida dubliniensis</i>	nem ismert
37	SZMC 1471	<i>Candida dubliniensis</i>	nem ismert
38	SZMC 1472	<i>Candida dubliniensis</i>	nem ismert
<b>Gram-pozitív baktériumok</b>			
<b><i>Staphylococcus</i> nemzetség</b>			
<b>Referencia</b>	<b>ATCC 25923</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	
39	ATCC 2913	<i>Staphylococcus aureus</i>	nem ismert
40	ATCC4300	<i>Staphylococcus aureus</i>	nem ismert
41	SZMC 14529	<i>Staphylococcus aureus</i>	nem ismert
42	SZMC 14530	<i>Staphylococcus aureus</i>	nem ismert
43	SZMC 14532	<i>Staphylococcus aureus</i>	nem ismert
44	SZMC 14531	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	nem ismert
<b><i>Enterococcus</i> nemzetség</b>			
<b>Referencia</b>	<b>ATCC 29212</b>	<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>	
45	SZMC 14538	<i>Enterococcus faecalis</i>	nem ismert
<b>Referencia</b>	<b>ATCC 8043</b>	<b><i>Enterococcus hirae</i></b>	
<b>Gram-negatív baktériumok</b>			
<b><i>Enterobacter</i> nemzetség</b>			
<b>Referencia</b>	<b>ATCC 13048</b>	<b><i>Enterobacter aerogenes</i></b>	
46	SZMC 6222E	<i>Enterobacter gergoviae</i>	nem ismert
47	SZMC 6223	<i>Enterobacter gergoviae</i>	nem ismert
48	SZMC 6224	<i>Enterobacter gergoviae</i>	nem ismert
49	SZMC 21890	<i>Enterobacter cloacea</i>	nem ismert
50	SZMC 21892	<i>Enterobacter cloaceae</i>	nem ismert

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

## 5.2 Tenyésztési módszerek

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

### 5.3 Spóraszuszpenziós oldatok készítése

*Aspergillus* és *Candida* gombatörzsek felületi tenyészeiből tömény spóraszuszpenziós törzsoldatokat készítettünk, míg a *Candida* törzsek tenyészeiből sejtsuszpenziót állítottunk elő (Balázs és mtsai. 2010). A spóra- és sejtszámot Bürker kamrás sejtszámlálóval határoztuk meg. Az oldatokból 7 osztatú, 10x-es hígítási sorokat készítettünk ( $10^6$ -1 spóra/ml) steril nukleáz mentes vízzel (Ambion™, Thermo Fisher Scientific, Maryland, USA).

### 5.4 Sejtek feltárása

A gombasejtek lízise mechanikai feltárással történt, Green Beads kerámiagyöngyök (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Svájc), és MagNA Lyser (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Svájc) készülék alkalmazásával (5000 rpm, 50 másodperc).

A log fázisban lévő baktérium kultúrákból pelletálást követően egy milliliternyi  $10^8$  baktériumsejtet tártunk fel. A Gram-pozitív baktériumok esetében a sejtfalat lizozim enzimet tartalmazó lízis koktéllal (20mg/ml enzim 20 mM-os TrisHCl oldatban, pH 8,0; 2 mM EDTA, 1,2% TritonX100) emésztettük.

### 5.5 Genomi DNS extrakció

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

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

Az izolált DNS mennyiségét és minőségét minden esetben NanoDrop-1000 spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies Inc., North Carolina, USA) ellenőriztük. Abban az esetben tekintettük az

elútumot megfelelőnek, amennyiben az izolált DNS 260/280 abszorbanca aránya >1,6 a 260/230 arány pedig  $\geq 1,8$ .

## 5.6 PCR reakcióparaméterek optimalizálása

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

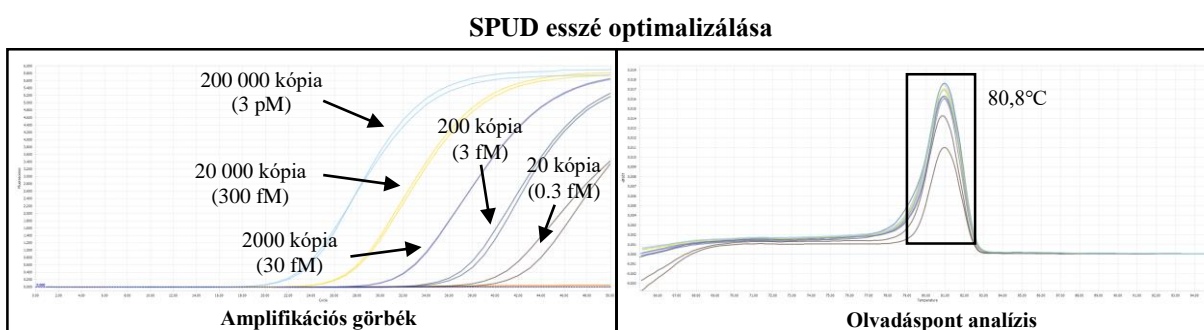
- **Primer koncentráció:** A HRM primereket 0,2 $\mu$ M-1,5 $\mu$ M végkoncentráció tartományban teszteltük.
- **Anellációs hőmérséklet:** Gradiens PCR reakciókat végeztünk 55-72 °C hőmérséklet tartományban.
- **Optimális MgCl<sub>2</sub> koncentráció meghatározása:** A kalibrálást 1-3,5 mM koncentráció tartományban végeztük a gyártó utasításai szerint.

## 5.7 PCR inhibíciós kontroll (SPUD esszé)

PCR inhibíció vizsgálatára a **Nolan** és mtsai. (2006) által leírt SPUD externál inhibíciós kontroll esszét alkalmaztuk, amelyet a *Solanum tuberosum* (burgonya) *phyB* gén (GenBank ID: Y14572) kimutatására tervezték. A SPUD esszével történő vizsgálatot a *Candida*- és *Aspergillus* HRM módszereinknél használt PCR hőmérsékleti paraméterekkel végezzük, de az interferencia elkerülése végett a fajazonosítástól külön reakcióban. A SPUD templát és primerek pontos szekvenciáit az alábbi táblázat mutatja:

Oligonukleotid	Szekvencia (5'-3')
SPUD templát	AACTTGGCTTTAATGGACCTCCAATTTTGAGTGTGCACAAGCTATGGAA CACCACGTAAGACATAAAACGGCCACATATGGTGCCATGTAAGGATGAATGT
SPUD forward primer	AACTTGGCTTTAATGGACCTCCA
SPUD reverz primer	ACATTCATCCTTACATGGCACCA

A PCR reakciók során 0,4  $\mu$ M primer koncentrációt alkalmazunk, a meghatározott optimális templát mennyiség 200 000 kópia, amely esetében a mért átlag C<sub>q</sub> értékek  $21,68 \pm 0,29$  voltak. A SPUD esszéhez tartozó amplikonok olvadási hőmérséklete 80,8 °C (6. ábra).



**6. ábra: Optimális SPUD templát mennyiség meghatározása.** A hígítási soron a következő átlag C<sub>q</sub> értéket mértük: 200 000 kópia: 21,68 C<sub>q</sub>; 20 000 kópia: 26,54 C<sub>q</sub>; 2 000 kópia: 31,08 C<sub>q</sub>; 200 kópia: 35,83 C<sub>q</sub>; 20 kópia: 41,30 C<sub>q</sub>.

## 5.8 A HRM PCR amplikonok validálása

### 5.8.1 *Aspergillus* HRM PCR amplikonok validálása kapilláris szekvenálással

Konvencionális PCR reakciókat végeztünk *Aspergillus* referenciatörzsekből kinyert 20 ng mennyiségű templát DNS jelenlétében. Az amplifikációhoz Phusion High-Fidelity PCR Master mix-et (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) alkalmaztunk a gyártó utasításai szerint. A PCR készüléken az általunk meghatározott HRM amplifikációs protokollt (V.7: 4. táblázat) állítottuk be. A keletkezett amplikonok méretét gélelektroforézissel vizsgáltuk (1% agaróz tartalmú gél, Tris-acetát-EDTA (TAE) pufferben), a DNS festéshez pedig etídium-bromid duplaszálú interkaláló festéket alkalmaztunk. Az egyenirányítón 90V feszültséget, és 55 mA áramerősséget használtunk a futtatáshoz. A fragmenseloszlást az agaróz gélen UV transzilluminátor készülékkel vizsgáltuk. A kapott DNS sávokat a gélből steril szike segítségével kivágtuk, és a géldarabokból visszanyertük a DNS-t QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden Németország) segítségével a

gyártó utasításai szerint. A DNS molekulákat ezt követően SigmaSpin™ Sequencing Clean-Up kittel (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) tisztítottuk a gyártó előírásai szerint. Kapilláris szekvenálást végeztünk BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kittel (Thermo Fisher Scientific, Maryland, USA) a gyártó utasításai szerint, ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer készüléken (Applied Biosystems, USA) mindkét irányban.

### 5.8.2 *Candida* HRM PCR amplikonok validálása agaróz gélelektroforézissel

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

## 5.9 Genomi ekvivalens meghatározás

A genomi ekvivalens (GE) azt a DNS mennyiséget fejezi ki, amely egy teljes genom méretét reprezentálja. Ennek meghatározásával olyan DNS panelek készíthetők, melyeken vizsgálható a PCR reakciók hatékonysága, és azok érzékenysége. A DNS relatív molekulatömegéből és az Avogadro állandóból a genomi ekvivalens a következő egyenlet alapján számolható ki:

$$\text{genomi ekvivalens (GE)} = \frac{\text{izolált DNS mennyisége (ng)} * 6,022 * 10^{23}}{\text{DNS moláris tömege} * 10^9}$$

A fent leírtak alapján az NCBI Genome adatbázisban található *Aspergillus fumigatus* (Af293) és *Candida albicans* (SC5314) referenciatörzsek genomi ekvivalenseit határoztuk meg:

Gombatörzs	Genom méret (Mb)	G-C arány (%)	1 GE
<i>Aspergillus fumigatus</i> (AF293)	28,7591	49,5	29,5 fg
<i>Candida albicans</i> (SC5314)	14,6768	33,7	15,055 fg

### 5.9.1 PCR reakciók kinetikája, dinamikus tartományok

Az *Aspergillus* és *Candida* genomi DNS paneleken ( $10^6$ -1 GE/PCR reakció) PCR méréseket, majd lineáris regressziós analízist végeztünk. A kapott Cq értékeket a DNS koncentrációk függvényében ábráztuk, és a pontokra egyenest illesztettünk. Az így kapott egyenes egyenletéből meghatároztuk a meredekséget illetve az  $R^2$  értékét (amely annak jellemzésére szolgál, hogy az amplitudonok mennyisége ciklusonként exponenciálisan emelkedik-e). Az egyenes meredekségéből a PCR hatékonyság az alábbi egyenlet alapján számítható ki:

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

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

### 5.9.2 Intra- és interaszé variancia

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

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

## 6. Eredmények

### 6.1 Az *Aspergillus* és *Candida* HRM primerek

Publikus adatbázisokban (EMBL/GeneBank) hozzáférhető annotált *Aspergillus* és *Candida*  $\beta$ -*tubulin* génszekvenciákban (*benA*, *TUB2*) kerestünk *in silico* vizsgálatokkal olvadási doméneket. A többszörös szekvenciaillesztést Clustal Omega szoftverrel végeztük. A primerek tapadási helyének a variábilis szakaszokat átfogó 30-40 bázis hosszúságú, részben konzervált gén régiókat választottunk, amelyek lehetővé teszik az *Aspergillus* és *Candida* gombafajok univerzális kimutatását. A megtervezett HRM PCR primerek (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) jellemzőit a **3. táblázat** foglalja össze.

**3. táblázat: A HRM primerek szekvenciája és jellemzői**

Szekvencia (5'-3')	Hossz (bp)	T <sub>m</sub> (°C)	GC arány (%)
<b><i>Aspergillus</i> HRM primerek</b>			
(ASP1_FW) CCAAGATCCGTGAGGAGTTC	20	58,10	55
(ASP1_REV) GTCTCGCGGAGTGCTCAA	19	58,47	58
(ASP2_FW) CAGCTGGAGCGCATGAACGTCTA	23	67,51	57
(ASP2_REV) ACGGCACGAGGTACATACTTGTTACCG	27	67,39	52
<b><i>Candida</i> HRM primerek</b>			
CTAAAATCAGAGAAGAATTCCCCTGATAGAATGATGGC	37	73,2	37,8
CAATTGACCTGGGATAACGTAAAGAAGTAGTAACACCAGACAT	43	74,2	38

Az *Aspergillus* gombák esetében a  $\beta$ -*tubulin* gén két külön régiójára terveztünk primereket (ASP1, ASP2), így az olvadásgörbe analízis során két olvadási csúcs alapján történik a fajazonosítás. Az *Aspergillus* HRM amplikonok közti *in silico* vizsgálattal meghatározott szekvencia eltéréseket a **7. ábra** mutatja. A *Candida* fajok kimutatásához egy primerpárt használunk (**8. ábra**). Mindkét nemzetségnél a két fő faj (*A. fumigatus*, *C. albicans*) biztos azonosítását tartottuk a legfontosabbnak, ezért az ábrákon a többi faj esetében megfigyelt szekvencia eltérések ezekhez mérten kiemeltük.

>Afulg10910|tuba COORDS:Chr1\_A\_fumigatus\_Af293:2848155-2850137C

C CAGCTGGAGCGTATGAACGTCTA TTTCAACGAGGTGTGTGGATGAAACTCTTGATTTATACTATTTCCG  
CAACATCTCACGATCTGACTCGTACTAGGCCAA CCGTGACAAATATGTTCCCTCGTGCCGT TCTGGTCGA  
TCTCGAGCCTGGTACCATGGACGCTGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGCGAGCTATCCGTCCCACAACCTC  
GTCTTCGGCCAGTCCGGTGTGGTAAACAACCTGGGCCAAGGGTCACTACACCGAGGGCGCCGAGTTGGTCG  
ACCAGGTTATCGATGTCGTCCGTGAGGCTGAAGGCTGTGACTGCCTCCAGGGCTTCCAGGTCACCA  
CTCTCTCGGTGGTGGTACCGGTGCCGGTATGGTACTCTTCTGATCT CCAAGATCCGTGAGGAGTTC CCG  
GACCGTATGATGGCGACCTTCTCCGTGTTCCCTCCCCAAGGTTTCCGACACTGTCGTTGAGCCTTACA  
ACGCTACCCTCTCCGTTACCAGCTCG TTGAGCACTCCGATGAGAC CTTT

>XM\_001210373.1 *Aspergillus terreus* NIH2624 tubulin beta chain (ATEG\_00287)

CCTC CAGCTCGAGCG CATGAACGTCTA TTTCAACGAGG CCAAGCGGAAACAAG TATGTTCCCTCGTGCCGT C  
CTCGTTGACCTTGAGCCCAGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCC  
ACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCTGGTGCCGGTAAACAACCTGGGCCAAGGGTCATTACACCGAGGGTGCCGA  
GCTCGTCGACAGGTTGTCGATGTTGTTTCGTGCGGAGGCTGAGGCTTGCCTCCAGGGTTTCCAG  
ATCACCCACTCTCTCGGTGGTGGTACCGGTGCCGGTATGGGTACCCTCCTTATCT CCAAGATCCGTGAGG  
AGTTCCCCGACCG CATGATGGC CACCTTCTCCGT CGTTCCCTC TCCAAGGT CTCCGACAC CGT GGTGA  
GCCTTACAACGC CACCCT TCCGT CACCAGCTCG TTGAGCACTCCGACGAGAC CTTTTGTATCGACAAC

>M38265.1 *A. flavus* beta-tubulin gene, complete cds

TACAATGGCTCCTCCGATCTC CAGCTGGAGCGTATGAACGTCTA TTTCAACGAGGTG CGTACCT CAAAAT  
TTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTC CTGACCGCTTC TCCAGGCCAG CCGAAACAAG TATGT CCT  
CGTGCCGT CCTCGTTGATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCT  
TCCGTCCCACAACCTTCGTTTTTCGGCCAGTCCGGTGTGGTAAACAACCTGGGCCAAGGGTCACTACCCGA  
GGGTGCCGAACCTGTTGACCAGGTTGTCGATGTTGTCGGTTCGCGAGGCTGAGGGCTGCGACTGCCTCCAG  
GGTTTCCAGATTACCCACTCCCTCGGTGGTGGTACCAGTCCGGTATGGGTACTCTCTGATCT CCAAGA  
TCCGTGAGGAGTT CCCCAGCGTATGATGGC CACTACTCCGTTGT CCCCCTCCCCAAGGT CTCCGACAC  
CGT TGGTTGAGCC CTACAACGC CACTCT TCCGT CACCAGCT TG TTGAGCACTCCGACGAGAC CTTCTGT

>MG701893.1 *Aspergillus niger* culture CBS:513.88 beta-tubulin gene

AAAGGGTTGGGTCTTCTGACACGCAGGATAGTTACAATGGCACCTCCGACCTC CAGCTGGAGCG CATGAA  
CGTCTA TTTCAACGAGGTG AGATCCATCGGAC CTTGGCTTT TTTACAGACAATATCAT CAATGTCTTAATC  
ACTTCAGCAGGCTAG CCGT AACAAG TATGTTCCCTCGTGCCGT CCTCGTCGACCTCGAGCCCAGTACCATG  
GACGCCGTCCGTGCCGGTCTTTTCGGCCAGCTCTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCCGGTG  
CTGGTAAACAACCTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGTCCGAGTTGGTTCGACAGGTTGTCGACGTTGT  
CCGCCGTGAGGCCGAGGCTTGCCTCCAGGGTTTCCAGATACCCACTCCCTCGGTGGTGGTACC  
GGTGCCGGTATGGGTACCCTCCTGATCT CCAAGATCCGTGAGGAGTT CCCCAGCGTATGATGGC CACT  
TCTCCGTTGTTCCCTCCCCAAGGT CTCCGACAC CGT TGGTTGAGCCTTACAACGC CACTCTCTCCGT CCA  
CCAGCTCG TTGAGCACTCCGACGAGAC CTTCTGTATCGACAACGAGGTATGATTCCAGACCCAGCACAAG

>FJ608381.1 *Aspergillus tubingensis* strain 2126 beta-tubulin mRNA, partial

GAGTTGGTTCGACAGGTTGTCGACGTTGTCCGCCGTGAGGCCGAGGCTTGCCTCCAGGGTTTCC  
AGATCACCCACTCCCTCGGTGGTGGTACCGGTGCCGGTATGGGTACCCTCCTGATCT CCAAGATCCGTGA  
GGAGTTCCCCGACCGTATGATGGC CACTTCTCCGTGTT CCCCCTCCCCAAGGT CTCCGACAC CGT TGGT  
GAGCCTTACAACGC CACTCTCTCCGT CACCAGCTCG TTGAGCACTCCGACGAGAC CTTCTGTATCGACA  
ACGAGGCTCTGTACGACATCTGCATGCGACCCTCAAGCTCTCCAACCCCTCTTACGGTGACCTGAACCA  
CCTGGTCTCTGCCGTATGTCGGTGTGACCACTGCCTCCGTTTCCCTGGCCAGCTCAACTCCGACCTC  
CGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTTCCCTTCCCTCGT

7. ábra: *Aspergillus* HRM amplikonok *in silico* vizsgálata Az NCBI adatbázisban az *Aspergillus fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. niger* és *A. tubingensis* szekvenciákat voltak megtalálhatóak. Az összehasonlítások során az *A. fumigatus* (Af 293) tekintettük referencia szekvenciának. A forward primerek pozícióját zöld, a reverz primerek pozícióit piros szín jelzi. Az amplikonokban fellelhető szekvencia eltéréseket fekete alapon fehér betűszín emeli ki. Az *A. tubingensis* referencia szekvenciában csak az egyik primerpár (ASP1) volt azonosítható.



>XM\_019475058.1 *Candida albicans* SC5314 beta-tubulin (TUB2), partial mRNA

```
GGTGGTACTGGTTCTGGTATGGGTACTTTGTTGATTTCTAAAATTAGAGAAGAATTCCTGATAGAATGA
TGGCCACTTTTTCTGTTGTCCCATCACAAAAGTTTCCGATACCGTTATTGAACCATATAACGCTACTTT
ATCAGTCCATCAATTGGTTGAAAACCTGATGAACTTTCTGTATTGATAATGAAGCCTTGTACAATATT
TGTCAAAACACTTTGAAATTACCACAACCATCTTATGCTGAATTGAACAATTTGGTTTCTTCTGTCTATGT
CTGGTGTTACTACTTCTTTACGTTATCCAGGTCAATTGAATTCCGATTTAAGAAAATTGGCAGTCAATTT
```

>XM\_002550030.1 *Candida tropicalis* MYA-3404 tubulin beta chain (CTRG\_04373), partial mRNA

```
ATGGGTACCTTGTTAATTTCTAAAATCAGAGAAGAATTCACAGATAGAATGATGGCTACTTTTTCTGTTG
TTCATCTCCAAAAGTCTCTGATACGTTTATCGAACCATATAATGCCACCTTATCTGTTTCATCAATTAAGT
TGAAAACCTCCGATGAAACATTCTGTATTGATAACGAAGCTTTGTAATAATTTGTCAAAAACCTTGAAA
TTACCACAACCATCATACGTTGAATTAACAACCTTGGTTTCGCTGTCTATGTCTGGTCTGACTACTTCTCT
TGCCTTACCCAGGTCAATTGAATCTGATTTGAGAAAATTGGCTGTCAACTTGGTTCCATTCCCAAGATT
```

>CR380957.2:1253221-1253761 *Candida glabrata* strain CBS138 chromosome K complete sequence

```
AACCATGAAGAAATGCAGTCTTGGGAAAGGAACCAAGTTGACGGCCAGTTTCTCAGATCGGAGTTCAAT
TGACCTGGGTAACGTAAGAGGTTGGTAACACCAGACATAACAATTGACACAAGATTATTTAGGTCATTTGT
AAGATGGTTGATTCAACTTCAAAGTTGTTTTGGCAAATTTCTGTAATAGAGCCTCCTTATTCGATACAGAAAGT
TTCATCTGAGTACTCGACTAATTGGTGAACAGACAGAGTGGCGTTATATGGTTTCGACCAACAGTGTCAAGAA
GTCCTTTGGAGATGGCAAGACTGAGAATGTTGCCATCATTCTATCAGGAAATTCTTCTCTGATTCTAGATA
```

>XM\_002416698.1 *Candida dubliniensis* CD36 beta tubulin, putative (CD36\_00640),

```
GGTGGTACTGGTTCTGGTATGGGTACTTTGTTGATTTCTAAAATTAGAGAAGAATTCCTGATAGAATGA
TGGCTTACATTTTTCTGTTGTCCCCTTACAAAAGTTTCTGATACAGTTATTGAACCATATAACGCTACATT
ATCAGTTTCATCAATTTGGTTGAAAATTTCTGATGAACTTTCTGTATTGATAATGAAGCCTTGTATAACATT
TGTCAAAACACTTTGAAATTACCACAACCATCTTATGCTGAATTGAATAAATTTGGTTTCTATCTGTCTATGT
CTGGTGTTACTACTTCTTTACGTTATCCAGGTCAATTGAATTCCGATTTAAGAAAATTAGCCGTCATTT
```

**8. ábra: *Candida* HRM amplikonok *in silico* vizsgálata** Az NCBI adatbázisban a *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* és *C. dubliniensis* szekvenciákat találtuk meg. Az összehasonlítást az *C. albicans* (SC5314) szekvenciához viszonyítva végeztük. A forward primerek pozícióját zöld, a reverz primerek pozícióit piros szín jelzi. Az amplikonokban található szekvencia eltéréseket fekete alapon fehér betűszínnel emeltük ki.

Az *Aspergillus fumigatus* (Af293) esetében 80- (ASP2) illetve 100 bázispár (ASP1) hosszúságúak az amplifikált szakaszok. Ehhez viszonyítva, az adatbázisban elérhető többi *Aspergillus* fajnál nem csak magában a szekvenciában, de az amplikonok hosszában is jelentős különbségek láthatók. A *Candida albicans* (SC5314) referencia gombatörzs  $\beta$ -tubulin génjének egy 202 bázispáros szakaszára terveztük a primereket, amelyet *in silico* vizsgálattal azonosítottunk a *C. glabrata*, *C. tropicalis* és *C. dubliniensis* fajokban. Legnagyobb szekvencia eltérés a *C. glabrata* szekvenciájában volt megfigyelhető. Az adatbázis lefedettsége hiányos volt, ezért több a HRM PCR módszerünkkel kimutatott *Candida* faj (*C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*) génszekvenciájáról nem volt található információ.

## 6.2 Optimális HRM PCR reakcióparaméterek

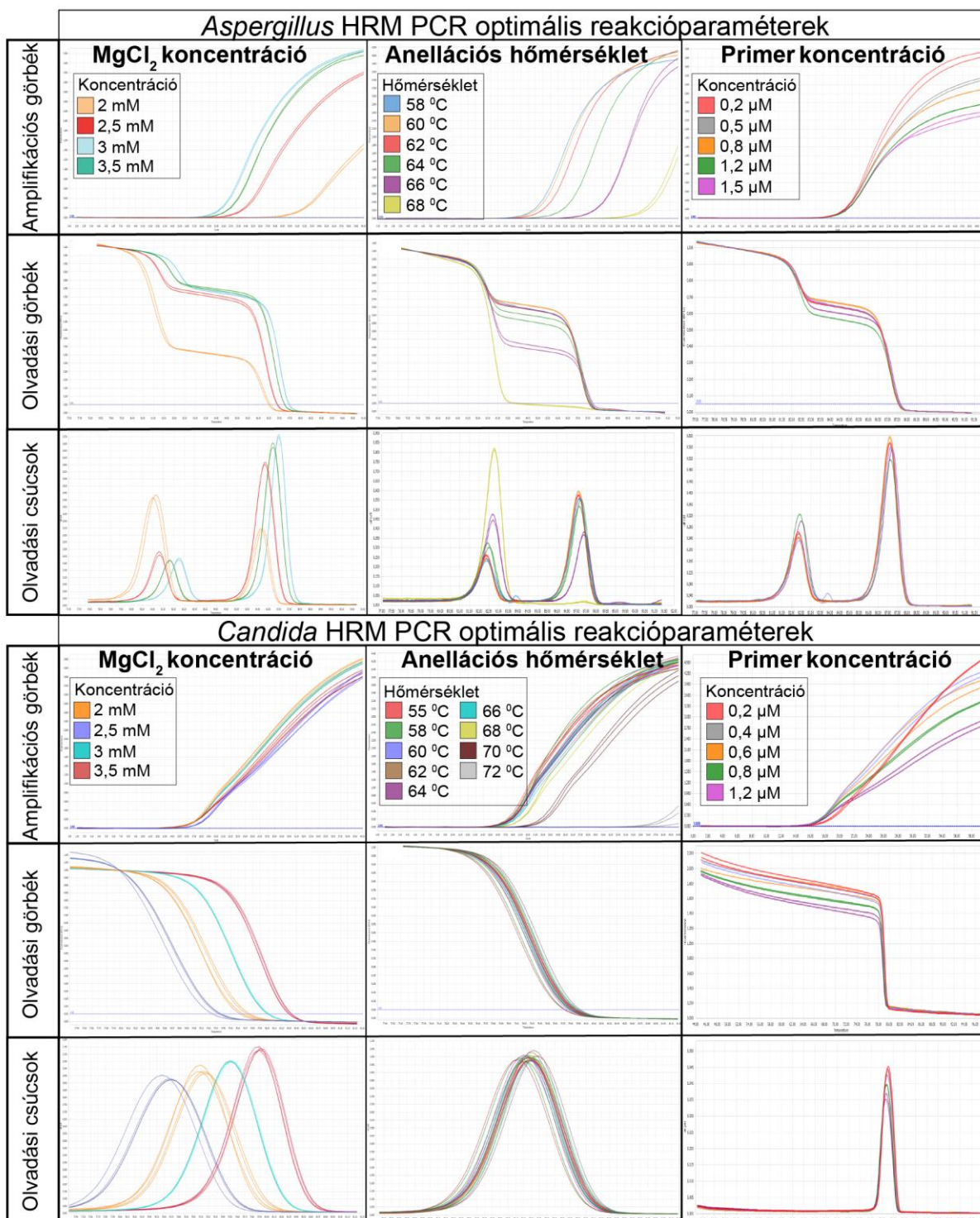
A HRM PCR reakcióparaméterek optimalizálása *A. fumigatus* (Af293) illetve *C. albicans* (ATCC 10231) referencia törzsekkel történt. A kísérletek során meghatároztuk a megfelelő  $MgCl_2$  és primer koncentrációkat, illetve az anellációs hőmérsékletet, amelyek eredményét a **9. ábra** szemlélteti.

A  $MgCl_2$  koncentráció kalibrálásakor elsődleges szempont volt, hogy az amplifikációs görbék alacsony  $C_q$  értéket és magas plató fázist mutassanak, ugyanakkor a HRM analízis során az olvadási csúcsok fluoreszcencia intenzitása is a lehető legmagasabb legyen. Alacsony  $MgCl_2$  (0,5-1,5 mM) jelenlétében nem tapasztaltunk amplifikációt. Az *Aspergillus* HRM esszé esetében 2-2,5 mM  $MgCl_2$  alkalmazásakor a többi koncentrációhoz (3-3,5 mM) mérten alacsonyabb amplifikációs hatékonyságot ezáltal magasabb  $C_q$  értékeket figyeltünk meg. Az *Aspergillus* HRM kísérletek során megállapítottuk, hogy mind az amplifikációs görbék, mind pedig az olvadási görbék tekintetében a 3 mM  $MgCl_2$  bizonyult a legmegfelelőbbnek. A *Candida* HRM esszé vizsgálatok szintén 3,5 mM  $MgCl_2$  jelenlétében kaptuk a legmagasabb olvadási csúcsot, azonban az amplifikáció 2 mM  $MgCl_2$ -nál volt a leghatékonyabb, mert itt kaptuk a legalacsonyabb ciklusszámot, ezért végül ezt tekintettük optimálisnak.

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

A primer koncentráció változtatása nem volt jelentős hatással az olvadási görbékre, közel azonos olvadási hőmérsékleteket mértünk, ellenben az amplifikációs görbék fluoreszcencia intenzitásában (plató fázis) figyeltünk meg különbségeket. Ez alapján megállapítottuk, hogy az

*Aspergillus* esszé hatékonysága 0,2-0,2 µM koncentrációjú primerek 1:1 arányú alkalmazásakor volt a legjobb. A *Candida* esszé esetén 0,4 µM primer koncentráció bizonyult optimálisnak.



9. ábra: A HRM PCR esszé reakcióparamétereinek optimalizálását összefoglaló PCR kísérleteket (Roche LightCycler® 96 ) eredményei

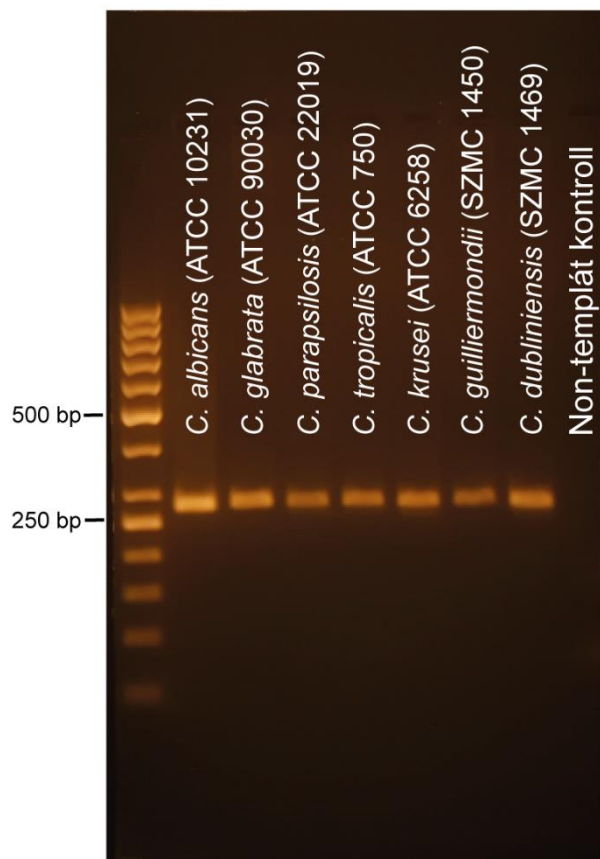
Az *Aspergillus*- és *Candida* HRM PCR reakciókhoz használt optimális reagens mennyiségeket és PCR hőmérsékleti protokollokat a **4. táblázat** foglalja össze. Az amplifikáció extenziós szakaszában végpontos mérést végzünk, ezzel lehetőségünk van az amplikonok és a mintában található gomba DNS mennyiségének meghatározására. Az olvadáspont analízisre az amplifikációt követően kerül sor, a reakcióközeget fokozatosan melegítve folyamatos méréssel monitorozzuk a fluoreszcens festék felszabadulását, és az amplikonok denaturációját. Az eredmények kiértékelését az *Aspergillus* kísérleteknél kizárólag LightCycler® 96 (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Svájc) szoftverrel, a *Candida* PCR kísérletek esetében pedig mindig az aktuális PCR készülék (LightCycler® 96, LightCycler® 2.0, LightCycler® Nano) dedikált kiértékelő programjával végeztük.

**4. táblázat: HRM PCR reakciók összetétele és alkalmazott hőmérsékleti paraméterek**

HRM PCR reakciók összetétele						
PCR reagens	<i>Aspergillus</i> HRM PCR			<i>Candida</i> HRM PCR		
Roche LightCycler® 480 high resolution melting master mix	10 µl			5 µl		
MgCl <sub>2</sub>	2,4 µl (3mM)			1 µl (2mM)		
Primerek	0,5-0,5 µl (0,5-0,5µM)			1 µl (0,5µM)		
DNS templát	6,6 µl (5ng/ µl)			3 µl (5ng/ µl)		
<b>Reakció végtérfogat</b>	<b>20 µl</b>			<b>10 µl</b>		
HRM PCR hőmérsékleti protokollok						
PCR program	<i>Aspergillus</i> HRM PCR protokoll			<i>Candida</i> HRM PCR protokoll		
	Hőmérséklet	Idő	Hőfokváltás	Hőmérséklet	Idő	Hőfokváltás
Kezdeti denaturáció						
	95 °C	10 perc	4,4 °C/mp	95 °C	10 perc	4,4 °C/mp
Amplifikáció (50 ciklus)						
Denaturáció	95 °C	10 mp	4,4 °C/mp	95 °C	10 mp	4,4 °C/mp
Anelláció	62 °C	15 mp	2,2 °C/mp	60 °C	10 mp	2,2 °C/mp
Extenzió (mérés 1)	72 °C	10 mp	4,4 °C/mp	72 °C	10 mp	4,4 °C/mp
Olvadási program						
Denaturáció	95 °C	60 mp		95 °C	15 mp	
DNS duplex képzés	40 °C	60 mp		40 °C	15 mp	
Olvadás (mérés 2)	65-95 °C			45-97 °C		

### 6.2.1 HRM PCR ampliconok validálása a meghatározott reakcióparaméterekkel

A *Candida* HRM PCR primerek target régióhoz való specifikus kötődését agaróz gélelektroforézissel igazoltuk (10. ábra). A gélképen mind a hét vizsgált *Candida* fajhoz tartozó PCR termék esetében egy jól körülhatárolt DNS sávot kaptunk, és méretük a 300 bázispáros fragmenshossz tartományba esett, hasonlóan az *in silico* analízis során meghatározott ampliconhosszokkal (281 bp). Aspecifikus termékképződés a gélképen nem volt látható.



**10. ábra: *Candida* HRM PCR ampliconok agaróz gélképe.** Minden faj esetén a 300 bp-os fragmenshossz tartományban egy jól látható sávot kaptunk, aspecifikus termékképződés nem volt tapasztalható.

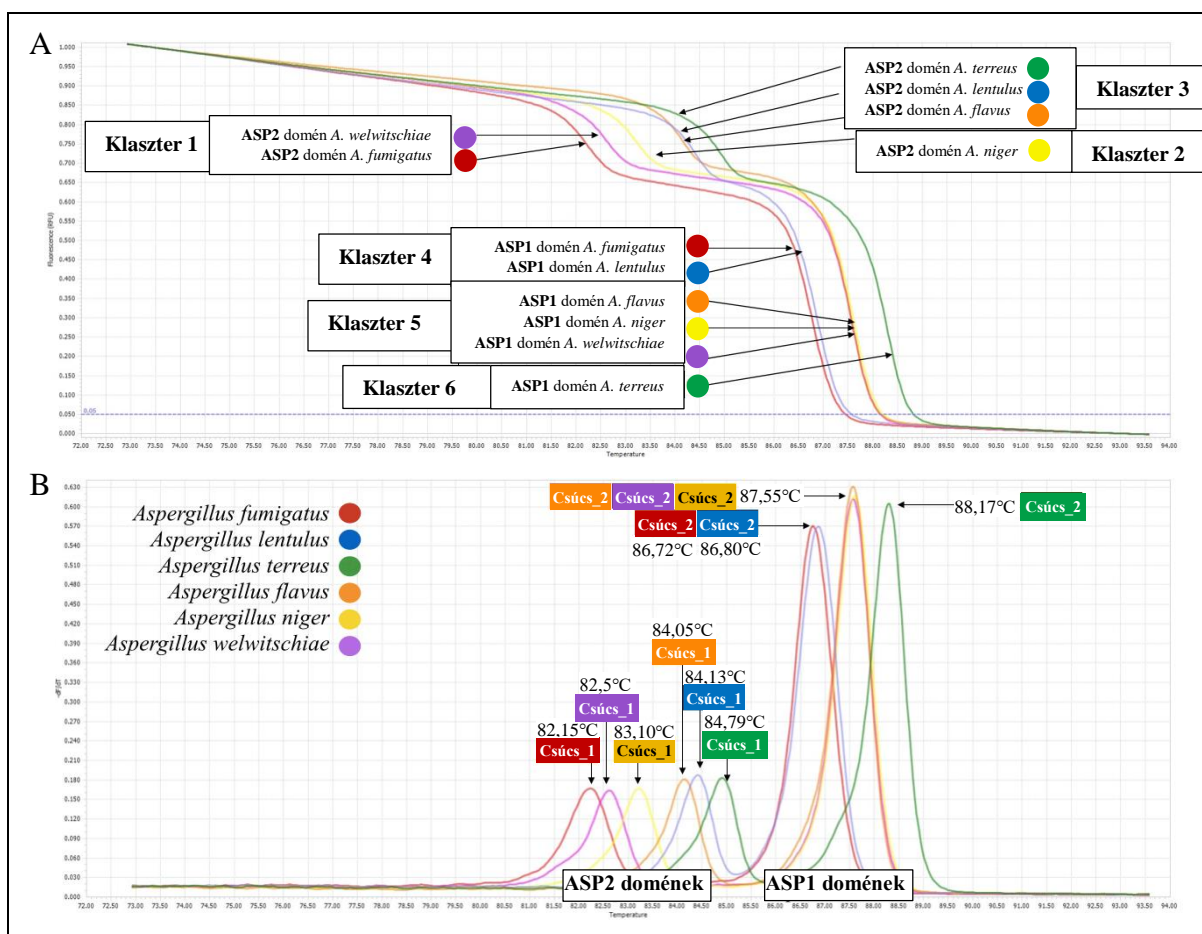
Az *Aspergillus* HRM PCR reakcióban két primerpárral (ASP1, ASP2) egyidejűleg szaporítottunk fel két  $\beta$ -tubulin génszakaszt, ezért indokoltnak tartottuk a módszerrel kimutatott *Aspergillus* fajokhoz tartozó PCR termékek szekvenciájának meghatározását. Ezt kapilláris szekvenálással végeztük, melynek eredményét a 11. ábra foglalja össze. Az ASP1 primerekkel amplifikált DNS szakaszok átlagos hossza  $139,5 \pm 1,05$  bázispár volt a detektált *Aspergillus* fajtól függően. A PCR reakciók során keletkező ampliconok becsült olvadási hőmérséklete  $83,8 - 85,3^\circ\text{C}$  közötti





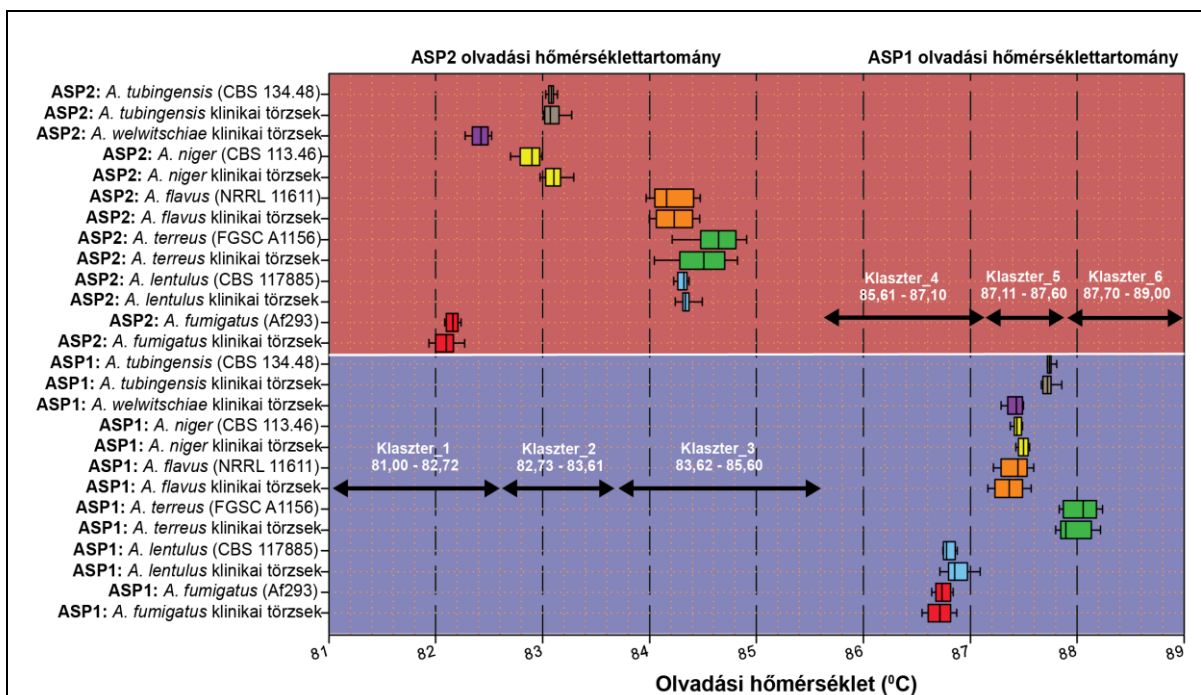
### 6.3 Az *Aspergillus* HRM PCR olvadási görbék jellemzése

A HRM analízis során az ASP1-ASP2 amplikonokat jellemző, egymással nem átfedő fajspecifikus kettős olvadási csúcsokat azonosítottunk, melyek alapján képesek vagyunk megkülönböztetni az *A. fumigatus*, *A. lentulus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. tubingensis* és *A. welwitschiae* gombafajokat. Az ASP2 olvadási doménre kisebb fluoreszcencia intenzitás és alacsonyabb olvadási hőmérséklettartomány (81-85,60°C) jellemző, összehasonlítva az ASP1 olvadási doménnel (85,61-89°C) (12. ábra).



12. ábra: Olvadási görbe mintázatok az *Aspergillus* típusörzseken. 12/A: ASP1-ASP2 olvadási görbék, 12/B: A vizsgált *Aspergillus* fajokra jellemző heteroduplex olvadási csúcsok.

Az *Aspergillus* fajokra jellemző teljes olvadási spektrum (81-89°C) összesen hat olvadási klaszterre osztható, melyek közül három klaszter foglalja magába az ASP1 domén olvadási csúcsait (Tm: 85,61 – 89°C), további három klaszter pedig az ASP2 doménhez tartozó olvadási csúcsokat (Tm:81.00 - 85.60°C) (13. ábra).



Színkód	<i>Aspergillus</i> gombatörzs	Min. érték (°C)	25th percentilis (°C)	Medián (°C)	75th percentilis (°C)	Max. érték (°C)
ASP1	<i>A. fumigatus</i> (Af293)	86,63	86,68	86,73	86,81	86,83
ASP1	<i>A. fumigatus</i> klinikai izolátumok	86,46	86,56	86,67	86,78	86,84
ASP1	<i>A. lentulus</i> (CBS 117885)	86,74	86,74	86,78	86,86	86,88
ASP1	<i>A. lentulus</i> klinikai izolátumok	86,72	86,80	86,85	86,97	87,09
ASP1	<i>A. terreus</i> (FGSC A1156)	87,83	87,86	88,05	88,17	88,23
ASP1	<i>A. terreus</i> klinikai izolátumok	87,80	87,84	87,89	88,13	88,21
ASP1	<i>A. flavus</i> (NRRL 11611)	87,22	87,28	87,42	87,57	87,61
ASP1	<i>A. flavus</i> klinikai izolátumok	87,07	87,10	87,16	87,37	87,44
ASP1	<i>A. niger</i> (CBS 11.346)	87,36	87,40	87,43	87,47	87,49
ASP1	<i>A. niger</i> klinikai izolátumok	87,42	87,44	87,50	87,53	87,55
ASP1	<i>A. welwitschiae</i> klinikai izolátumok	87,28	87,35	87,43	87,49	87,50
ASP1	<i>A. tubingensis</i> (CBS 134.48)	83,02	83,05	83,08	83,10	83,13
ASP1	<i>A. tubingensis</i> klinikai izolátumok	83,00	83,01	83,06	83,15	83,27
ASP2	<i>A. fumigatus</i> (Af293)	82,12	82,43	82,56	82,61	82,67
ASP2	<i>A. fumigatus</i> klinikai izolátumok	81,92	82,08	82,15	82,53	82,58
ASP2	<i>A. lentulus</i> (CBS 117885)	84,21	84,25	84,31	84,35	84,36
ASP2	<i>A. lentulus</i> klinikai izolátumok	84,23	84,30	84,33	84,37	84,48
ASP2	<i>A. terreus</i> (FGSC A1156)	84,20	84,47	84,64	84,80	84,90
ASP2	<i>A. terreus</i> klinikai izolátumok	84,04	84,28	84,50	84,70	84,81
ASP2	<i>A. flavus</i> (NRRL 11611)	83,97	84,04	84,15	84,41	84,46
ASP2	<i>A. flavus</i> klinikai izolátumok	83,99	84,06	84,22	84,40	84,46
ASP2	<i>A. niger</i> (CBS 11.346)	82,70	82,79	82,90	82,97	83,00
ASP2	<i>A. niger</i> klinikai izolátumok	82,97	83,03	83,10	83,17	83,29
ASP2	<i>A. welwitschiae</i> klinikai izolátumok	82,28	82,33	82,41	82,48	82,52
ASP2	<i>A. tubingensis</i> (CBS 134.48)	87,71	87,72	87,74	87,75	87,81
ASP2	<i>A. tubingensis</i> klinikai izolátumok	87,66	87,68	87,72	87,76	87,85

13. ábra: A vizsgált *Aspergillus* fajokra jellemző ASP1-ASP2 olvadási hőmérséklettartományok. Hat különböző klasztert különítettünk el az ASP1-ASP2 amplikonokhoz tartozó olvadási hőmérsékletek alapján. Klaszter\_1: *A. fumigatus*, *A. welwitschiae*; Klaszter\_2: *A. niger*, *A. tubingensis*; Klaszter\_3: *A. terreus*, *A. lentulus*, *A. flavus*; Klaszter\_4: *A. fumigatus*, *A. lentulus*; Klaszter\_5: *A. flavus*, *A. welwitschiae*, *A. tubingensis*; Klaszter\_6: *A. terreus*.

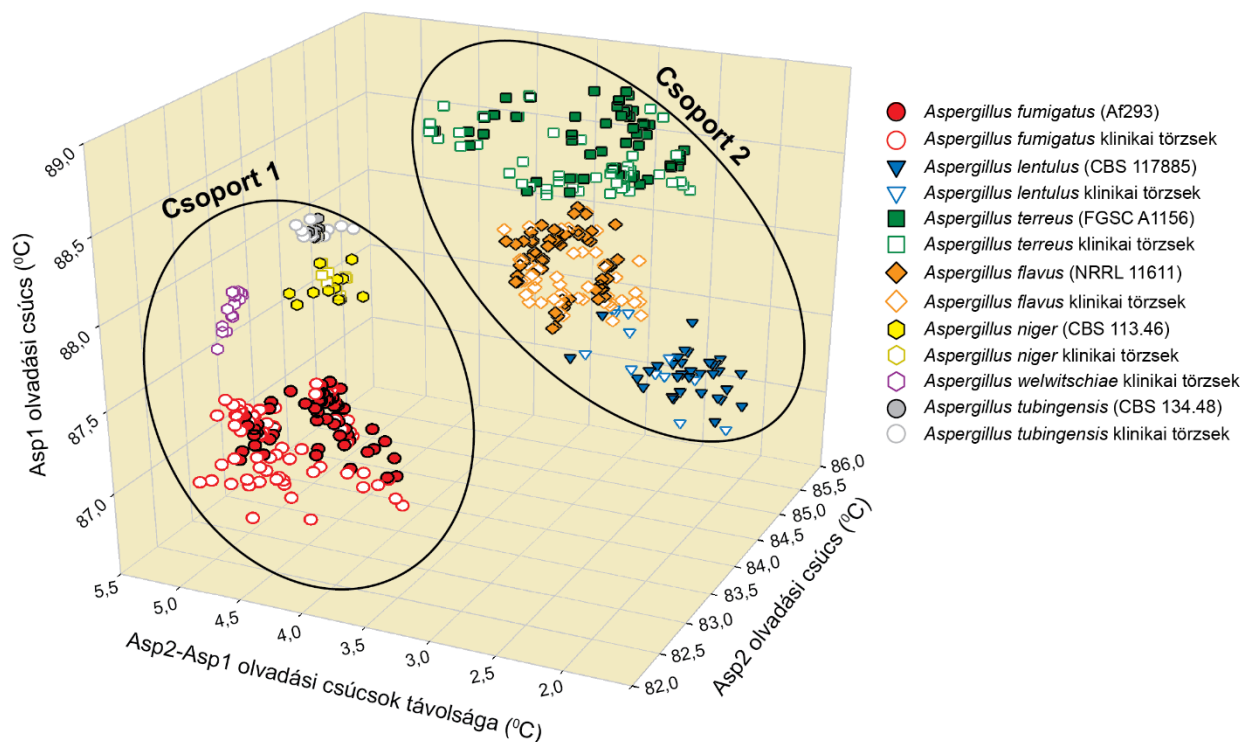


Az egyes klasztereket jellemző hőmérséklettartományok a következők: klaszter\_1 (81,00-82,72°C); klaszter\_2 (82,73-83,61°C); klaszter\_3 (83,62-85,60°C); klaszter\_4 (85,61-87,10°C); klaszter\_5 (87,11-87,64°C); klaszter\_6 (87,65-89,00°C). Az ASP1-ASP2 klaszterek kombinációja alapján egyedi kétszámjegyű kód rendelhető az egyes *Aspergillus* fajokhoz, amely alkalmas azok elkülönítésére: *A. fumigatus* (1,4), *A. lentulus* (3,4), *A. terreus* (3,6), *A. flavus* (3,5), *A. niger* (2,5), *A. wewitschiae* (1,5) és *A. tubingensis* (2,7) (5. táblázat).

**5. táblázat: Az ASP1-ASP2 doméneken belüli klasztermegoszlások, és az olvadási klaszterek hőmérséklettartománya alapján az *Aspergillus* fajokhoz rendelt kétszámjegyű azonosító kódok**

Vizsgált <i>Aspergillus</i> klinikai gombatörzsek	Átlag T <sub>m</sub> (±SD)						Kód	
	ASP2 olvadási tartomány (81,00 – 85,50°C)			ASP1 olvadási tartomány (83,61 – 89,00°C)				
	Klaszter_1 81,00- 82,72°C	Klaszter_2 82,73- 83,61°C	Klaszter_3 83,62-85,60°C	Klaszter_4 85,61-87,10°C	Klaszter_5 87,11-87,64°C	Klaszter_6 87,65-89,00°C		
<i>A. terreus</i> (SZMC 2414)	-	-	84,13±0,04	-	-	88,10±0,04	3	6
<i>A. terreus</i> (SZMC 2424)	-	-	84,35±0,04	-	-	87,84±0,04	3	6
<i>A. terreus</i> (SZMC 2460)	-	-	84,60±0,13	-	-	87,84±0,04	3	6
<i>A. terreus</i> (SZMC 22546)	-	-	84,04±0,05	-	-	88,19±0,04	3	6
<i>A. terreus</i> (SZMC 22547)	-	-	84,90±0,07	-	-	87,84±0,06	3	6
<i>A. terreus</i> (SZMC 22548)	-	-	84,88±0,06	-	-	87,81±0,05	3	6
<i>A. terreus</i> (SZMC 22549)	-	-	84,79±0,05	-	-	88,17±0,04	3	6
<i>A. fumigatus</i> (SZMC 2504)	82,18±0,07	-	-	86,81±0,05	-	-	1	4
<i>A. fumigatus</i> (SZMC 2490)	82,07±0,08	-	-	86,75±0,07	-	-	1	4
<i>A. fumigatus</i> (SZMC 2486)	82,22±0,08	-	-	86,84±0,07	-	-	1	4
<i>A. fumigatus</i> (SZMC 22550)	82,17±0,09	-	-	86,77±0,06	-	-	1	4
<i>A. fumigatus</i> (SZMC 22551)	82,08±0,06	-	-	86,72±0,03	-	-	1	4
<i>A. fumigatus</i> (SZMC 22552)	82,13±0,04	-	-	86,77±0,05	-	-	1	4
<i>A. fumigatus</i> (SZMC 22553)	82,12±0,07	-	-	86,75±0,09	-	-	1	4
<i>A. fumigatus</i> (SZMC 22554)	82,18±0,10	-	-	86,79±0,08	-	-	1	4
<i>A. fumigatus</i> (SZMC 3111)	81,85±0,09	-	-	86,40±0,09	-	-	1	4
<i>A. fumigatus</i> (SZMC 3109)	82,12±0,09	-	-	86,71±0,06	-	-	1	4
<i>A. fumigatus</i> (SZMC 3100)	82,07±0,10	-	-	86,63±0,14	-	-	1	4
<i>A. fumigatus</i> (SZMC 3117)	82,07±0,15	-	-	86,66±0,12	-	-	1	4
<i>A. fumigatus</i> (SZMC 3106)	81,99±0,10	-	-	86,60±0,05	-	-	1	4
<i>A. fumigatus</i> (SZMC 3104)	81,98±0,04	-	-	86,58±0,03	-	-	1	4
<i>A. lentulus</i> (SZMC 3118)	-	-	84,36±0,11	86,82±0,08	-	-	3	4
<i>A. lentulus</i> (SZMC 3123)	-	-	84,32±0,05	86,79±0,06	-	-	3	4
<i>A. lentulus</i> (SZMC 20911)	-	-	84,10±0,05	87,03±0,06	-	-	3	4
<i>A. flavus</i> (SZMC 22583)	-	-	84,12±0,07	-	87,24±0,08	-	3	5
<i>A. flavus</i> (SZMC 22582)	-	-	84,12±0,07	-	87,24±0,08	-	3	5
<i>A. flavus</i> (SZMC 22581)	-	-	84,16±0,10	-	87,27±0,05	-	3	5
<i>A. flavus</i> (SZMC 22580)	-	-	84,10±0,06	-	87,47±0,07	-	3	5
<i>A. flavus</i> (SZMC 22579)	-	-	84,06±0,10	-	87,12±0,09	-	3	5
<i>A. flavus</i> (SZMC 22578)	-	-	84,03±0,06	-	87,45±0,05	-	3	5
<i>A. flavus</i> (SZMC 22577)	-	-	84,16±0,11	-	87,58±0,06	-	3	5
<i>A. flavus</i> (SZMC 22575)	-	-	84,05±0,12	-	87,48±0,14	-	3	5
<i>A. niger</i> (SZMC 3119)	-	83,01±0,06	-	-	87,52±0,06	-	2	5
<i>A. niger</i> (SZMC 3108)	-	83,07±0,10	-	-	87,35±0,12	-	2	5
<i>A. wewitschiae</i> (SZMC 2402)	82,26±0,30	-	-	-	87,35±0,12	-	1	5
<i>A. wewitschiae</i> (SZMC 23407)	82,37±0,11	-	-	-	87,38±0,11	-	1	5
<i>A. wewitschiae</i> (SZMC 23406)	82,48±0,05	-	-	-	87,48±0,04	-	1	5
<i>A. wewitschiae</i> (SZMC 23408)	82,48±0,05	-	-	-	87,45±0,05	-	1	5
<i>A. tubingensis</i> (SZMC 2758)	-	83,05±0,03	-	-	-	87,77±0,06	2	5
<i>A. tubingensis</i> (SZMC 3127)	-	83,11±0,02	-	-	-	87,71±0,06	2	5

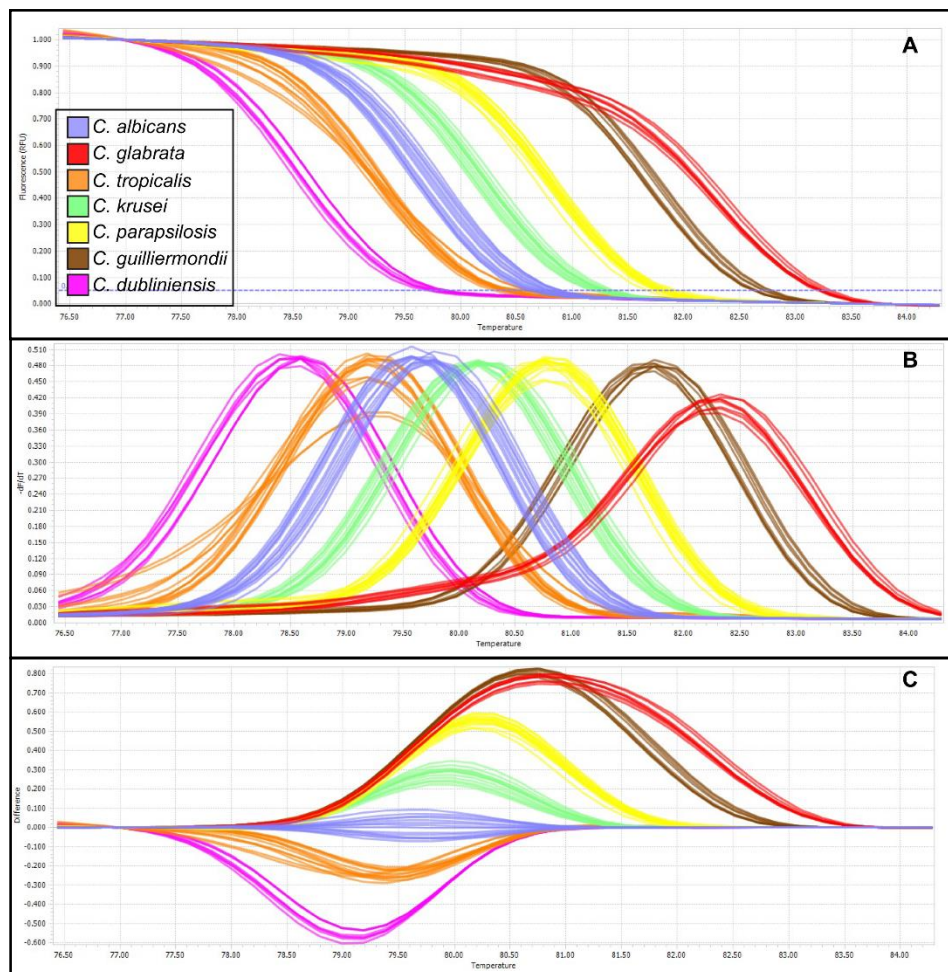
Vizsgáltuk a fajokhoz tartozó ASP1-ASP2 olvadási doméneket a heteroduplexeken belüli csúcstávolságok függvényében (14. ábra). A grafikonon két nagyobb csoport különíthető el. Az első csoportba (Csoport 1) az *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. welwitschiae* és *A. tubingensis* fajok tartoznak, melyek olvadási csúcshőmérsékleteit leíró pontok szemmel láthatóan jól elkülönülnek egymástól. A második csoportot (Csoport 2) az *Aspergillus terreus*, *A. flavus* és *A. lentulus* fajok alkotják, melyek között kisebb távolság figyelhető meg. Az *A. lentulus* gombafaj esetében néhány kiugró érték átfedést mutatott az *A. flavus* gombatörzsekkel. Ennek feltehetően mérési hiba lehetett az oka, mert az *A. lentulus* csoport középpontja egyértelműen elkülönül az *A. flavus* értékeitől.



**14. ábra:** Az *Aspergillus* olvadási csúcsok háromdimenziós megoszlása az olvadási hőmérsékletek és az ASP1-ASP2 domének távolsága alapján. Az *Aspergillus* HRM esszé sajátossága, hogy két olvadási görbe alapján történik a fajazonosítás, ezáltal számításba vehető a két olvadási csúcs abszolút távolsága is, így valamelyest növelhető a módszer megbízhatósága. Ez különösen hasznos lehet olyan esetekben, amikor az olvadási hőmérsékletek eltolódnak, emiatt az eredmény bizonytalan. Az ábrán ugyanakkor megfigyelhető, hogy a fajokat reprezentáló pontok két fő csoportra oszlanak, így redukálható a lehetséges fajok száma. Például, amennyiben a kapott olvadási hőmérsékletek az első csoportban foglalnak helyet (Csoport 1), biztosan kizárható, hogy *A. lentulus*, *A. flavus* vagy *A. terreus* található a mintában.

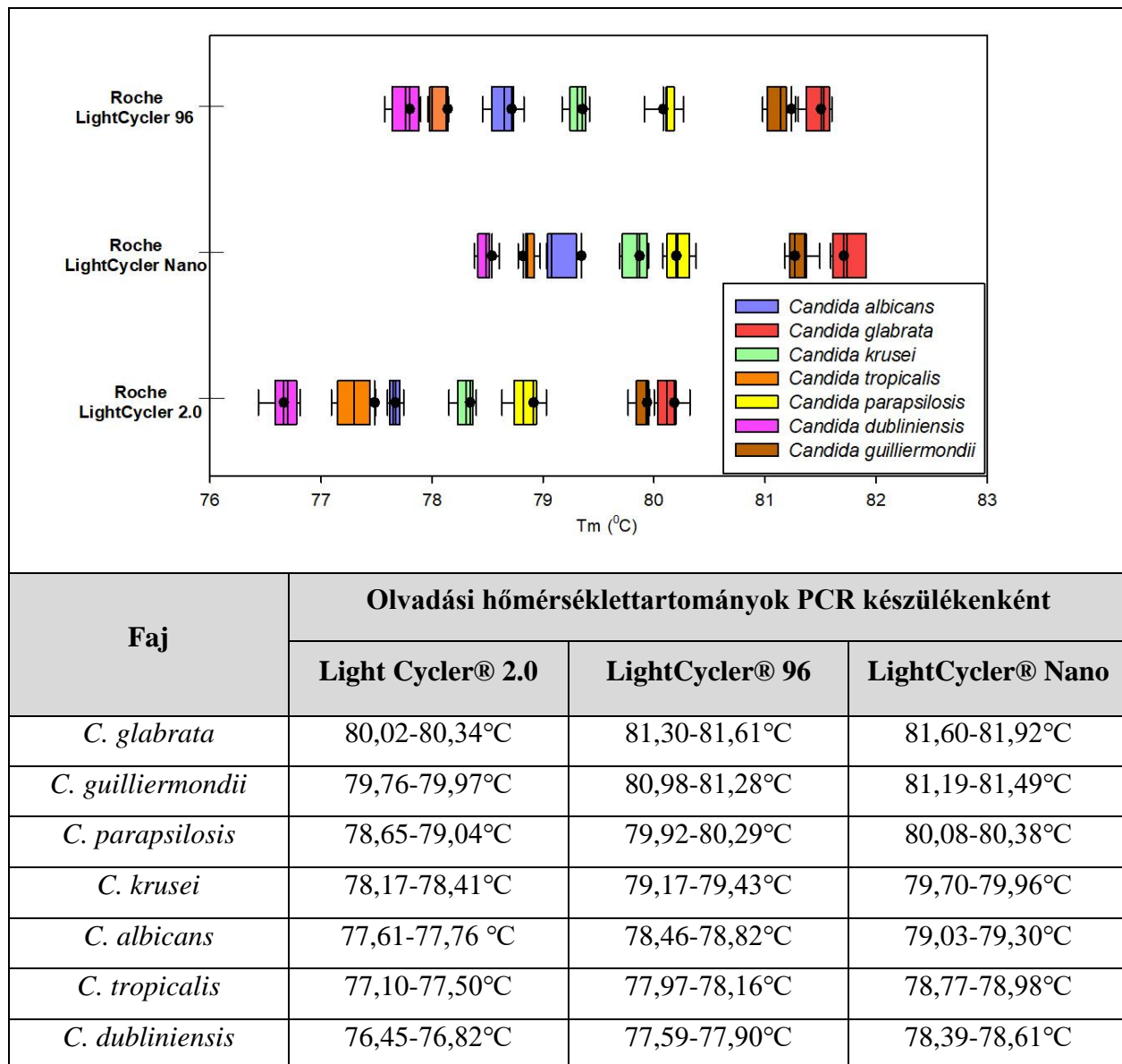
## 6.4 A *Candida* HRM PCR olvadási görbék jellemzése

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



**15. ábra:** *Candida* fajokhoz tartozó olvadási görbe mintázatok (Roche LightCycler® 96 készülék). A normalizált olvadási görbék kinetikája (A), az olvadási csúcsok (B) és a differencia görbék (C) 7 db elkülönülő fajspecifikus olvadási klasztert mutattak. A fajonként meghatározott olvadáspontok növekvő sorrendben: *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*.

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



**16. ábra:** *Candida* olvadási hőmérséklettartományok a három PCR készülék esetében. Az ábrához tartozó táblázat összefoglalja a különböző *Candida* típus törzsek és klinikai izolátumok esetében mért olvadási hőmérsékleteket.

## 6.5 Esszé keresztreakciók

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

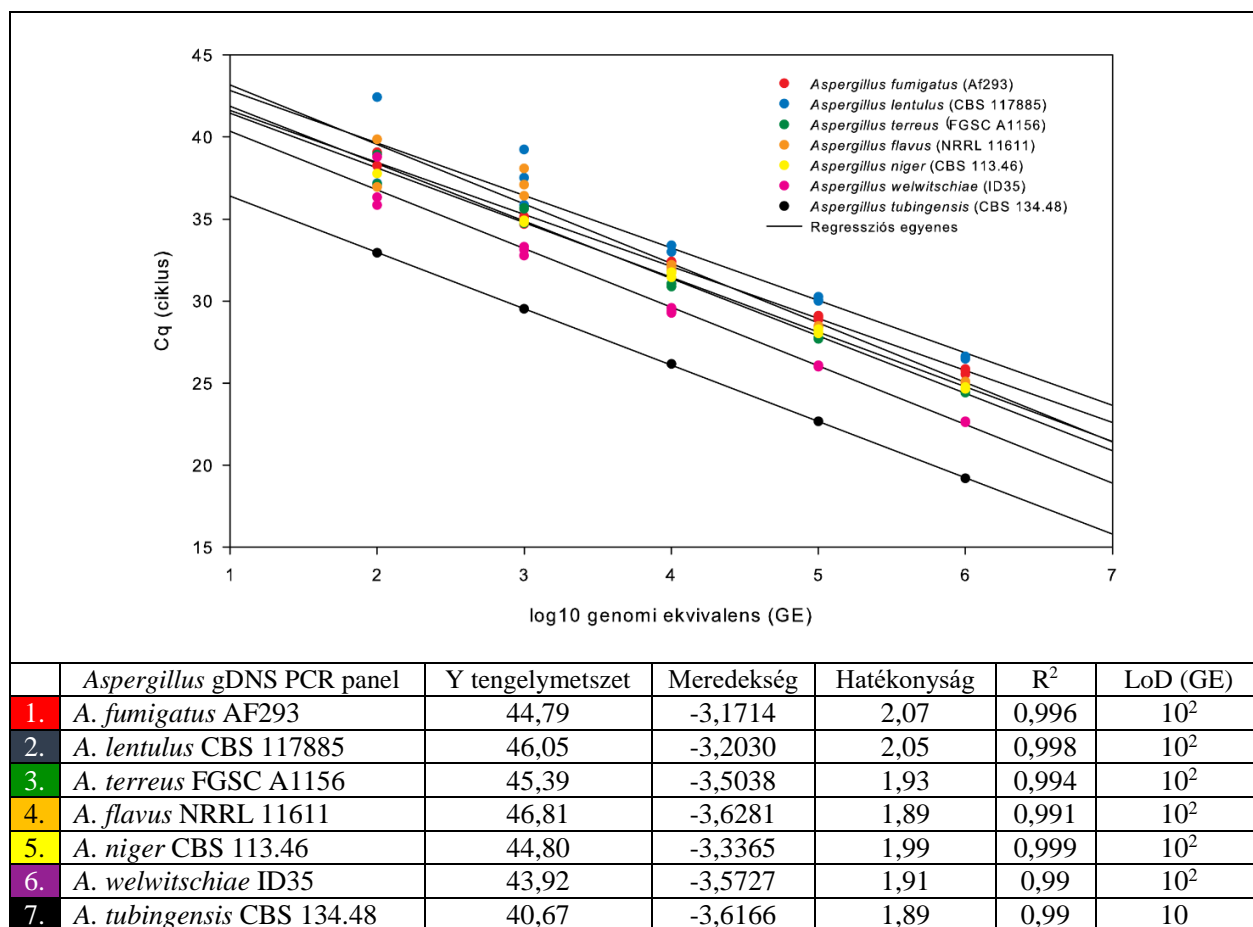
- ***Aspergillus* HRM PCR esszé:** A *Candida* típusú törzsek (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*) esetében gyenge álpozitivitás volt tapasztalható, ugyanakkor magas DNS templát koncentráció ellenére is alacsony volt az amplifikációs hatékonyság ( $C_q > 38$ ). A HRM analízis során a *Candida* fajokhoz tartozó olvadási görbék kinetikája a megszokottól eltérő volt, és az amplikonok olvadási hőmérséklete is alacsonyabb volt, mint az *Aspergillus* fajok esetében mért hőmérsékletek ( $T_m < 81^\circ\text{C}$ ). Az *Aspergillus udagawe* és *A. viridinutans* esetében csak egy olvadási csúcsot kaptunk ( $T_m$ : 85,38-85,41 $^\circ\text{C}$ ; 86,12-86,17 $^\circ\text{C}$ ). Szintén egy olvadási csúcsot tapasztaltunk több *Fusarium* gombatörzs vizsgálatakor: *F. napiforme* ( $T_m$ : 87,61-87,68 $^\circ\text{C}$ ), *F. delphinoides* ( $T_m$ : 87,60 $^\circ\text{C}$ ), *F. verticillioides* ( $T_m$ : 87,81-87,90 $^\circ\text{C}$ ), *F. oxysporum* ( $T_m$ : 87,30-87,56 $^\circ\text{C}$ ), *F. solani* ( $T_m$ : 87,44-87,57 $^\circ\text{C}$ ), *F. incarnatum* ( $T_m$ : 86,31-86,44 $^\circ\text{C}$ ). A két *Scedosporium auranticum* izolátum esetében ugyancsak egy amorf olvadási csúcs volt látható ( $T_m$ : 84,11-84,22 $^\circ\text{C}$ ).
- ***Candida* HRM PCR esszé:** Az *Aspergillus* nemzetség vizsgálatakor az *A. fumigatus*, *A. lentulus*, *A. viridinutans* és *A. udagawe* esetében tapasztaltunk keresztreakciót. Ezek olvadási hőmérséklete a *Candida* fajokra jellemző tartomány felett ( $T_m$ : 86,35 $\pm$ 0,16 $^\circ\text{C}$ ) volt, a kapott olvadási csúcsok nem voltak fajspecifikusak, és egymással átfedést mutattak. Amorfi olvadási csúcsokat kaptunk a *Rhizopus oryzae* ( $T_m$ : 77,38 $^\circ\text{C}$ ) és *Scedosporium auranticum* ( $T_m$ : 75,73 $^\circ\text{C}$ ) fajok esetében, és nagy mennyiségű DNS jelenlétében is igen alacsony amplifikációs hatékonyság volt tapasztalható.

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

## 6.6 Analitikai szenzitivitás és a HRM módszerek megbízhatósága

### 6.6.1 Dinamikus tartomány, detektálási határ (LoD)

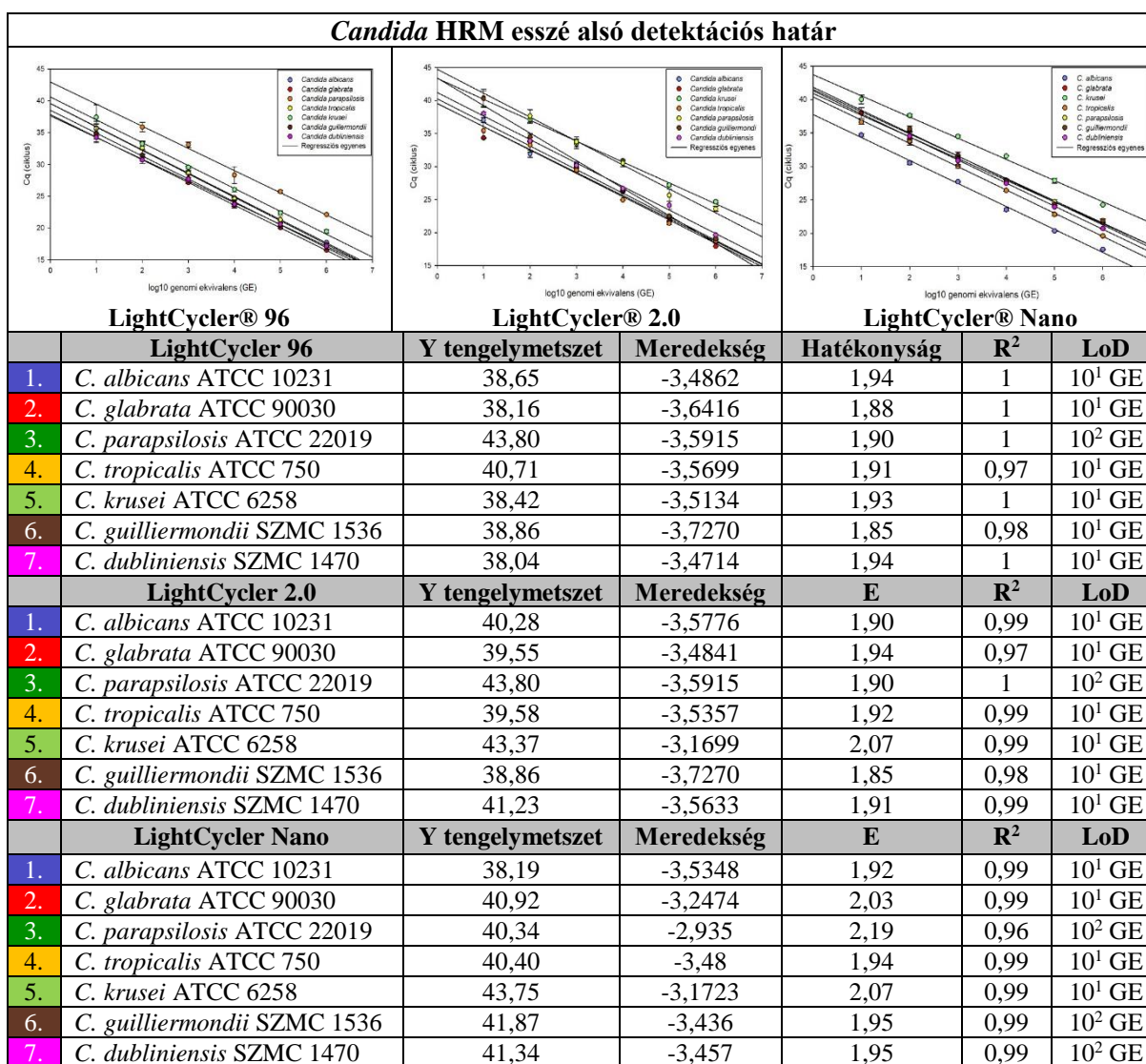
Az *Aspergillus* referencia törzsek esetében az alsó detektálási határ összességében 3pg DNS ( $10^2$  GE) volt (17. ábra). Kivételt képzett ez alól az *Aspergillus tubingensis* gDNS panel (LoD: 10 GE), ugyanakkor a HRM analízis során ebben az esetben csak egy olvadási csúcsot kaptunk, ezért ilyen kis koncentrációnál a fajazonosítás a heteroduplex olvadási csúcsok hiányában nem megbízható. A PCR reakciók hatékonyságát lineáris regressziós analízissel határoztuk meg. A kapott regressziós egyenesek meredeksége a vizsgált fajtól függően -3,1714 és -3,6281 értékek közé esett. Az  $R^2$  értéke mindegyik *Aspergillus* faj esetében nagyobb volt, mint 0,99. A reakciók hatékonysága (E) az *Aspergillus fumigatus* és *Aspergillus lentulus* referencia törzseknél volt a legmagasabb (E: 2,07; 2,05), legalacsonyabb pedig az *A. flavus* esetében (E: 1,89).



17. ábra: *Aspergillus* HRM PCR esszé analitikai szenzitivitása (Roche LightCycler® 96 készülék). Figyelembe véve az olvadási görbe mintázatokat, a megbízható fajazonosítás alsó határa  $10^2$  GE (3 pg DNS) volt.



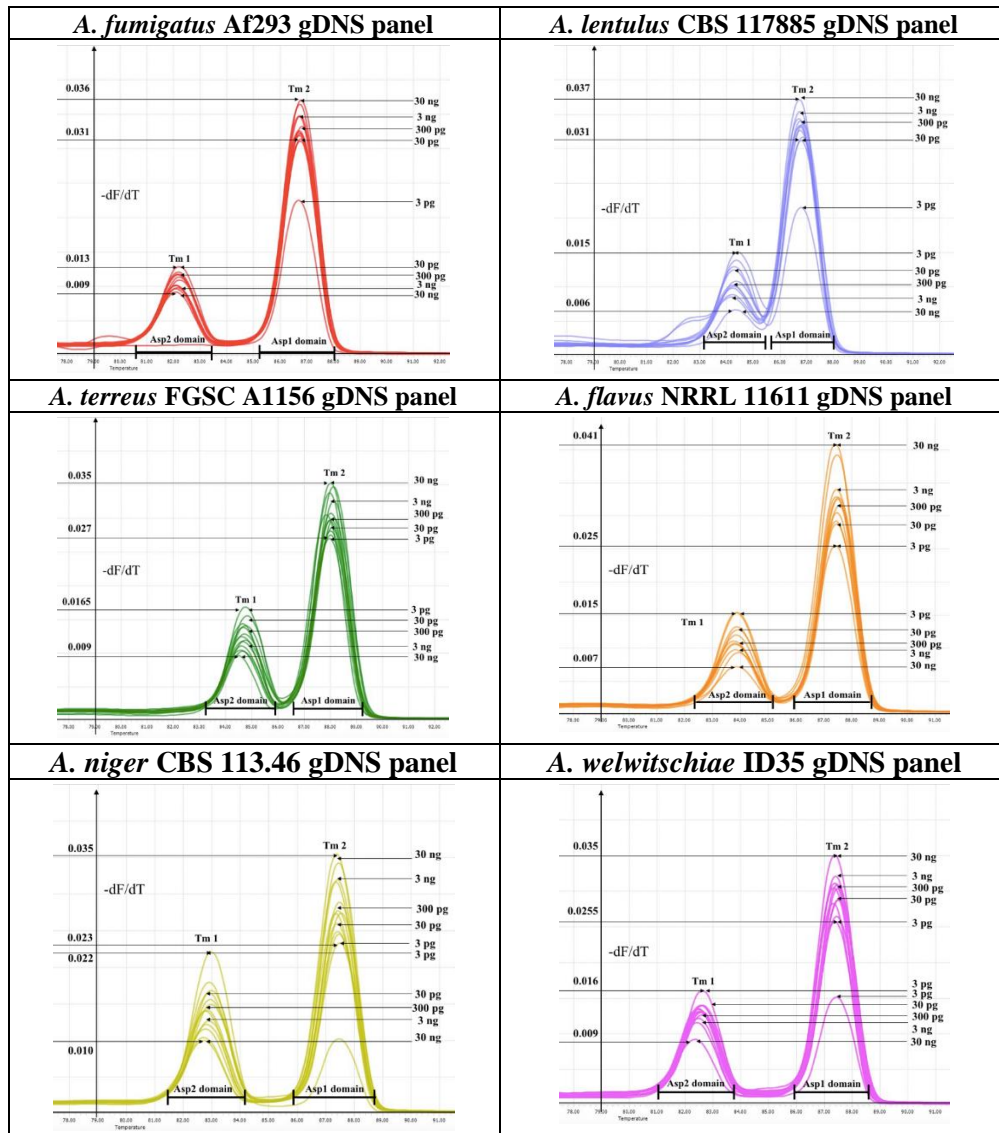
A *Candida* HRM PCR esszé szenzitivitását három PCR készüléken is meghatároztuk. A Roche LightCycler® 96 és Roche LightCycler® 2.0 készülékek érzékenysége hasonlóan bizonyult az általunk vizsgált *Candida* referencia gombatörzseken, de a Roche LightCycler® Nano készülék több *Candida* faj esetében is csökkent érzékenységet mutatott. A *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* és *C. krusei* fajoknál az alkalmazott PCR készüléktől függetlenül 10 CFU/ml (0,2 GE/PCR reakció) volt az alsó detektálási határ. Összeségében a *Candida parapsilosis* esetében alacsonyabb szenzitivitást tapasztaltunk (100 CFU/ml). A *Candida guilliermondii* és *C. dubliniensis* fajoknál pedig eltérő szenzitivitást tapasztaltunk a különböző PCR platformokon. A PCR reakciók hatékonysága szinte minden esetben meghaladta az 1,9-es értéket, kivéve a *Candida guilliermondii* faj esetében a LightCycler® 96 és LightCycler® 2.0 platformokon (18. ábra).



18. ábra: *Candida* HRM esszé analitikai szenzitivitása a három Roche PCR készüléken

## 6.6.2 Fajazonosítás határa (LoI)

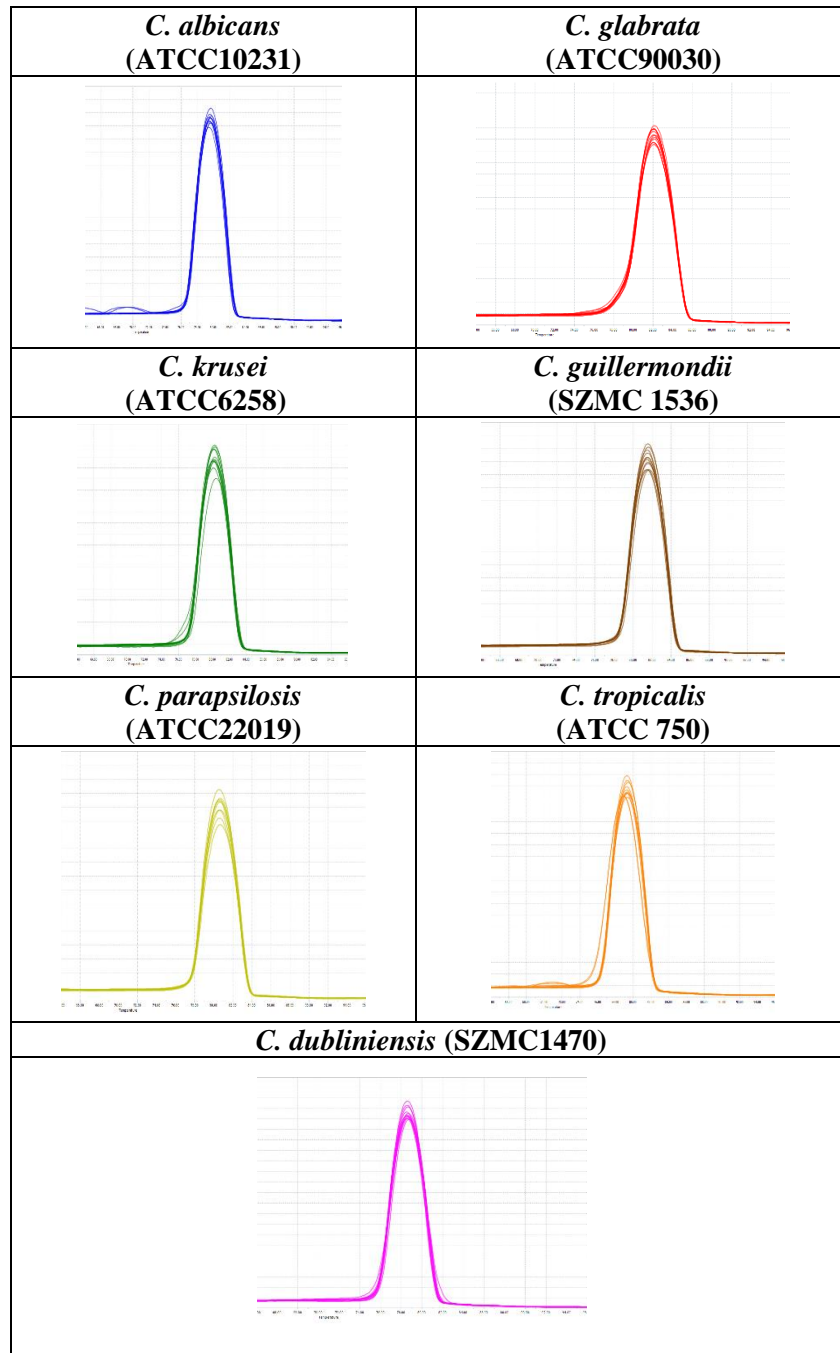
Alacsony templát DNS mennyiség mellett sem tapasztaltunk jelentős olvadási hőmérséklet eltolódást egyik HRM PCR esszé esetében sem. Az *Aspergillus* olvadási csúcsok a  $10^2$  GE tartományig a fajokra jellemző heteroduplex mintázatot mutatták (19. ábra). Alacsonyabb templát DNS mennyiség mellett az ASP1 olvadási csúcs fluoreszcencia intenzitásának csökkenése volt megfigyelhető.



19. ábra: Olvadási csúcsok változása csökkenő templát DNS koncentráció függvényében *Aspergillus* referencia törzseken. Alacsonyabb DNS koncentrációnál az olvadási csúcsok ellaposodása figyelhető meg, de az olvadási hőmérsékletekben nem volt eltolódás.



A *Candida* HRM PCR esszé használata során nem tapasztaltunk DNS templát koncentrációfüggést az olvadási csúcsokban, továbbá hőmérséklet eltolódás sem volt mérhető (20. ábra). A fajazonosítás alsó határa (LoI) megegyezett az esszé analitikai szenzitivitásának vizsgálata során meghatározott értékekkel.



20. ábra: *Candida* fajspecifikus olvadási csúcsok fluoreszcencia intenzitásának és a templát DNS mennyiségének viszonya. A LoD és LoI értéke megegyezett, koncentrációfüggés nem volt látható.

### 6.6.3 Intra- és interesszé variancia

A HRM eszköz reprodukálhatóságát klinikai gDNS paneleken (*Aspergillus*: 3 panel, *Candida*: 4 panel) vizsgáltuk. Az ASP1-ASP2 olvadási hőmérsékletek összesített átlagából számított intraesszé variancia mind a hét *Aspergillus* faj esetében 4% alatt volt. Legnagyobb szórást az *Aspergillus welwitschiae* olvadási hőmérsékletében figyeltünk meg (3,15-3,19%). Az interesszé varianciák szintén nagyon alacsonynak bizonyultak (0,01-0,06%). A variancia értékek átlaga alapján a teljes variancia szintén alacsony (2,48%) volt (6. táblázat).

6. táblázat: *Aspergillus* HRM PCR esszé intra- és inter varianciája klinikai izolátumokon

	<i>Aspergillus</i> gDNS panel_1		<i>Aspergillus</i> gDNS panel_2		<i>Aspergillus</i> gDNS panel_3	
	ASP1 átlag T <sub>m</sub> (°C) ± (SD)	ASP2 átlag T <sub>m</sub> (°C) ± (SD)	ASP1 átlag T <sub>m</sub> (°C) ± (SD)	ASP2 átlag T <sub>m</sub> (°C) ± (SD)	ASP1 átlag T <sub>m</sub> (°C) ± (SD)	ASP2 átlag T <sub>m</sub> (°C) ± (SD)
<b><i>A. fumigatus</i> klinikai törzsek</b>	86,69±0,12	82,08±0,12	86,69±0,15	82,06±0,12	86,71±0,11	82,11±0,11
Összesített átlag	84,39°C		84,38°C		84,41°C	
Standard deviáció	±(2,36°C)		±(2,36°C)		±(2,34°C)	
Intraesszé variancia	2,80%		2,80%		2,78%	
<b><i>A. lentulus</i> klinikai törzsek</b>	86,82±0,13	84,27±0,17	86,88±0,11	84,18±0,17	86,93±0,13	84,28±0,14
Összesített átlag	85,56°C		85,53°C		85,61°C	
Standard deviáció	±(1,42°C)		±(1,49°C)		±(1,46°C)	
Intraesszé variancia	1,61%		1,71%		1,7%	
<b><i>A. terreus</i> klinikai törzsek</b>	87,94±0,19	84,50±0,36	87,97±0,17	84,54±0,34	88,00±0,17	84,54±0,36
Összesített átlag	86,30°C		86,25°C		86,27°C	
Standard deviáció	±(1,73°C)		±(1,80°C)		±(1,82°C)	
Intraesszé variancia	2,00%		2,09%		2,11%	
<b><i>A. flavus</i> klinikai törzsek</b>	87,35±0,18	84,15±0,10	87,33±0,15	84,03±0,07	87,42±0,16	84,12±0,05
Összesített átlag	85,75°C		85,68°C		85,77°C	
Standard deviáció	±(1,66°C)		±(1,71°C)		±(1,71°C)	
Intraesszé variancia	1,94%		1,99%		1,99%	
<b><i>A. niger</i> klinikai törzsek</b>	87,54±0,04	83,12±0,04	87,47±0,04	83,01±0,05	87,53±0,04	83,07±0,07
Összesített átlag	85,35°C		85,24°C		85,3°C	
Standard deviáció	±(2,34°C)		±(2,38°C)		±(2,38°C)	
Intraesszé variancia	2,74%		2,79%		2,79%	
<b><i>A. welwitschiae</i> klinikai törzsek</b>	87,38±0,09	82,38±0,98	87,43±0,11	82,37±0,23	87,46±0,05	82,45±0,07
Összesített átlag	84,87°C		84,90°C		85,0°C	
Standard deviáció	±(2,67°C)		±(2,70°C)		±(2,68°C)	
Intraesszé variancia	3,15%		3,19%		3,15%	
<b><i>A. tubingensis</i> klinikai törzsek</b>	87,70±0,04	83,09±0,03	87,74±0,11	83,08±0,06	87,78±0,03	83,08±0,05
Összesített átlag	85,40°C		85,41°C		85,43°C	
Standard deviáció	±(2,47°C)		±(2,49°C)		±(2,51°C)	
Intraesszé variancia	2,89%		2,92%		2,94%	
<b>Teljes variancia</b>	<b>2,48%</b>					

A *Candida* HRM esszé esetében (7. táblázat) a technikai párhuzamosok és a fajokhoz tartozó olvadási hőmérsékletek varianciája egyaránt alacsony volt (0,06-0,21%). Az összesített variancia értéke: 0,12%.

7. táblázat: *Candida* HRM esszé variancia klinikai gombatörzsek esetében

<i>Candida</i> klinikai törzsek	Klinikai PCR panel_1	Klinikai PCR panel_2	Klinikai PCR panel_3	Klinikai PCR panel_4
	Átlag T <sub>m</sub> (°C)±SD	Átlag T <sub>m</sub> (°C)±SD	Átlag T <sub>m</sub> (°C)±SD	Átlag T <sub>m</sub> (°C)±SD
<i>Candida albicans</i>	78,59±0,15	78,62±0,06	78,58±0,12	78,60±0,06
Intraesszé variancia	<b>0,19%</b>	<b>0,08%</b>	<b>0,15%</b>	<b>0,08%</b>
<i>Candida glabrata</i>	81,53±0,11	81,47±0,11	81,55±0,12	81,50±0,11
Intraesszé variancia	<b>0,13%</b>	<b>0,14%</b>	<b>0,15%</b>	<b>0,14%</b>
<i>Candida parapsilosis</i>	80,23±0,1	80,23±0,13	80,23±0,05	80,22±0,11
Intraesszé variancia	<b>0,12%</b>	<b>0,16%</b>	<b>0,06%</b>	<b>0,14%</b>
<i>Candida tropicalis</i>	78,03±0,09	78,04±0,08	77,99±0,1	78,02±0,10
Intraesszé variancia	<b>0,12%</b>	<b>0,1%</b>	<b>0,13%</b>	<b>0,13%</b>
<i>Candida krusei</i>	79,25±0,09	79,26±0,09	79,32±0,1	79,25±0,08
Intraesszé variancia	<b>0,11%</b>	<b>0,11%</b>	<b>0,13%</b>	<b>0,1%</b>
<i>Candida guilliermondii</i>	81,14±0,12	81,06±0,09	81,16±0,04	81,09±0,1
Intraesszé variancia	<b>0,15%</b>	<b>0,11%</b>	<b>0,05%</b>	<b>0,12%</b>
<i>Candida dubliniensis</i>	77,74±0,12	77,85±0,11	77,62±0,05	77,76±0,16
Intraesszé variancia	<b>0,15%</b>	<b>0,14%</b>	<b>0,06%</b>	<b>0,21%</b>
PCR panel variancia	<b>0,14%</b>	<b>0,12%</b>	<b>0,10%</b>	<b>0,13%</b>
<b>Összesített variancia</b>	<b>0,12%</b>			

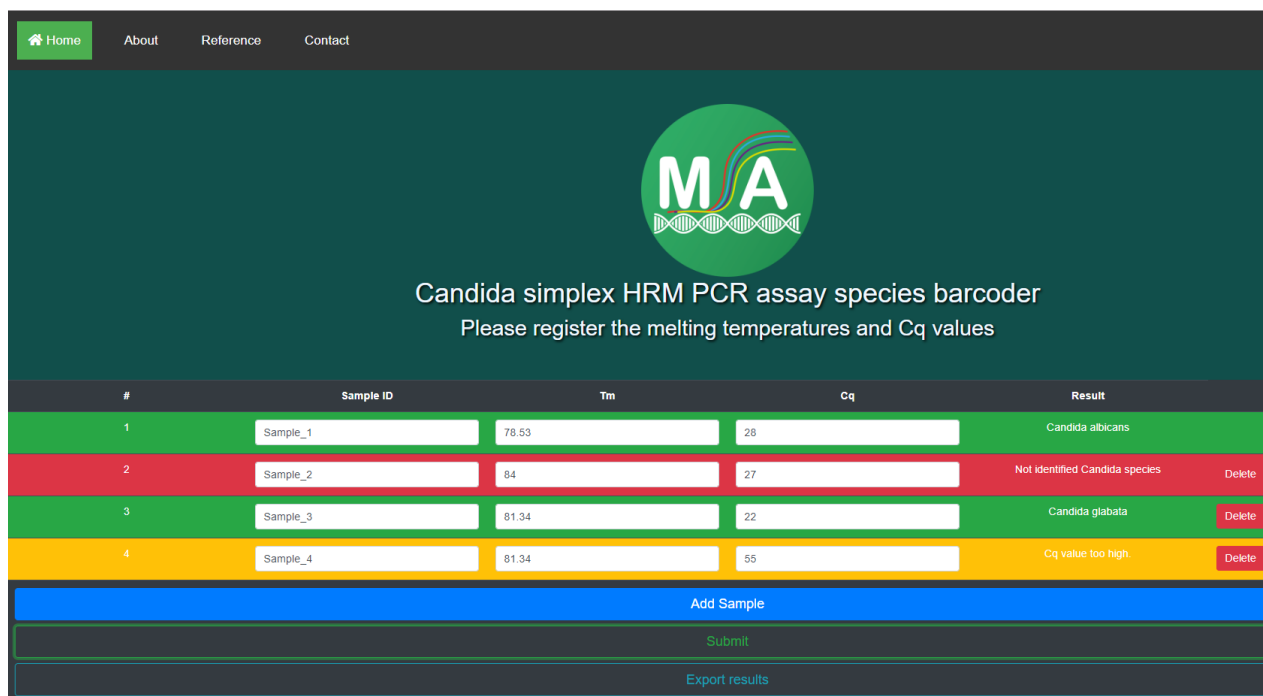
Vizsgáltuk a hét *Candida* referencia törzsön az olvadási hőmérsékletek szórását eltérő DNS templát mennyiség (7,5ng-75fg/10µl) jelenlétében. A kapott olvadási hőmérsékletekben minden esetben 1% alatti szórást tapasztaltunk, és jelentős eltolódást még az alacsony koncentráció tartományokban sem mértünk (8. táblázat). A kalkulált intraesszé variancia ezeken a paneleken 0,01-0,2% közötti volt. A teljes esszé variancia szintén alacsonynak bizonyult (0,11%).

8. táblázat: *Candida* HRM esszé variancia standard hígítási sorokon

PCR panel	gDNS/10 µl	Std. panel_1 Tm1 (°C)	Std. panel_2 Tm2 (°C)	Std. panel_3 Tm3 (°C)	T <sub>m</sub> átlag ±SD	Variancia (%)
<i>Candida albicans</i> (ATCC10231) panel_1	7,5 ng	78,49; 78,51	78,71; 78,57	78,68; 78,50	78,57±0,09	<b>0,11</b>
	0,75 ng	78,71; 78,77	78,82; 78,76	78,70; 78,71	78,75±0,05	<b>0,06</b>
	75 pg	78,6; 78,68	78,74; 78,69	78,71; 78,82	78,71±0,06	<b>0,08</b>
	7,5 pg	78,73; 78,85	78,95; 78,84	78,74; 78,68	78,79±0,1	<b>0,13</b>
	0,75 pg	78,92; 78,94	78,94; 78,88	78,66; 78,59	78,82±0,16	<b>0,2</b>
	75 fg	78,77; -	78,93; -	78,76; -	78,82±0,1	<b>0,13</b>
	T <sub>m</sub> átlag ±SD	78,74±0,14	78,80±0,12	78,70±0,1		
<b>Panel_1 variancia (%)</b>	<b>0,2</b>	<b>0,15</b>	<b>0,13</b>			
<i>Candida glabrata</i> (ATCC90030) panel_2	7,5 ng	81,42; 81,46	81,43; 81,47	81,42; 81,44	81,44±0,02	<b>0,02</b>
	0,75 ng	81,38; 81,41	81,41; 81,36	81,43; 81,44	81,41±0,03	<b>0,04</b>
	75 pg	81,55; 81,62	81,42; 81,48	81,50; 81,48	81,51±0,07	<b>0,09</b>
	7,5 pg	81,48; 81,57	81,58; 81,55	81,46; 81,53	81,53±0,05	<b>0,06</b>
	0,75 pg	81,39; 81,44	81,66; 81,63	81,54; 81,59	81,54±0,11	<b>0,13</b>
	75 fg	81,57; 81,64	81,64; 81,58	81,62; 81,68	81,63±0,04	<b>0,05</b>
	T <sub>m</sub> átlag ±SD	81,49±0,09	81,52±0,10	81,51±0,08		
<b>Panel_2 variancia (%)</b>	<b>0,11</b>	<b>0,12</b>	<b>0,01</b>			
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC22019) panel_3	7,5 ng	79,92; 79,91	79,89; 79,9	79,98; 80,12	79,95±0,09	<b>0,11</b>
	0,75 ng	80,12; 80,18	80,23; 80,17	80,25; 80,16	80,19±0,05	<b>0,06</b>
	75 pg	80,15; 80,09	79,96; 79,94	80,17; 80,15	80,08±0,1	<b>0,12</b>
	7,5 pg	80,11; 80,13	80,23; 80,15	80,23; 80,17	80,17±0,05	<b>0,06</b>
	0,75 pg	79,93; 79,96	80,12; 80,0	80,09; 80,07	80,03±0,08	<b>0,1</b>
	75 fg	-; -	-; -	-; -	-	-
	T <sub>m</sub> átlag ±SD	80,05±0,11	80,06±0,14	80,14±0,07		
<b>Panel_3 variancia (%)</b>	<b>0,14</b>	<b>0,17</b>	<b>0,09</b>			
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 750) panel_4	7,5 ng	78,15; 78,17	78,17; 78,16	78,29; 78,25	78,20±0,06	<b>0,08</b>
	0,75 ng	78,17; 78,13	78,27; 78,19	78,22; 78,28	78,21±0,06	<b>0,08</b>
	75 pg	78,03; 78,08	78,19; 78,13	78,27; 78,22	78,15±0,09	<b>0,12</b>
	7,5 pg	78,19; 78,07	78,2; 78,28	78,17; 78,29	78,2±0,08	<b>0,10</b>
	0,75 pg	78,28; 78,21	78,38; 78,39	78,20; 78,15	78,27±0,10	<b>0,12</b>
	75 fg	78,24; 78,15	78,22; 78,23	78,14; 78,27	78,21±0,05	<b>0,06</b>
	T <sub>m</sub> átlag ±SD	78,16±0,07	78,23±0,08	78,23±0,05		
<b>Panel_4 variancia (%)</b>	<b>0,09</b>	<b>0,10</b>	<b>0,06</b>			
<i>Candida krusei</i> (ATCC 6258) panel_5	7,5 ng	79,26; 79,28	79,28; 79,27	79,4; 79,37	79,31±0,06	<b>0,08</b>
	0,75 ng	79,34; 79,39	79,28; 79,33	79,32; 79,28	79,32±0,04	<b>0,05</b>
	75 pg	79,45; 79,41	79,31; 79,39	79,45; 79,35	79,39±0,06	<b>0,08</b>
	7,5 pg	79,41; 79,48	79,5; 79,46	79,28; 79,33	79,41±0,09	<b>0,11</b>
	0,75 pg	79,29; 79,32	79,29; 79,3	79,34; 79,48	79,34±0,07	<b>0,09</b>
	75 fg	79,31; 79,36	79,55; 79,4	79,32; 79,29	79,37±0,1	<b>0,13</b>
	T <sub>m</sub> átlag ±SD	79,36±0,07	79,36±0,1	79,35±0,06		
<b>Panel_5 variancia (%)</b>	<b>0,09</b>	<b>0,13</b>	<b>0,08</b>			
<i>Candida guilliermondii</i> (SZMC 1536) panel_6	7,5 ng	81,19; 81,03	81,02; 81,08	81,27; 81,24	81,14±0,11	<b>0,14</b>
	0,75 ng	81,23; 81,33	81,29; 81,28	81,02; 81,14	81,22±0,12	<b>0,15</b>
	75 pg	81,26; 81,34	81,32; 81,34	81,21; 81,33	81,30±0,05	<b>0,06</b>
	7,5 pg	81,21; 81,34	81,37; 81,34	81,28; 81,32	81,31±0,06	<b>0,07</b>
	0,75 pg	81,23; 81,28	81,24; 81,25	81,12; 81,17	81,22±0,06	<b>0,07</b>
	75 fg	81,11; 81,31	81,07; 81,16	81,42; 81,38	81,24±0,15	<b>0,18</b>
	T <sub>m</sub> átlag ±SD	81,24±0,1	81,23±0,12	81,24±0,12		
<b>Panel_6 variancia (%)</b>	<b>0,12</b>	<b>0,15</b>	<b>0,14</b>			
<i>Candida dubliniensis</i> (SZMC 1470) panel_7	7,5 ng	77,86; 77,67	77,67; 77,73	77,89; 77,90	77,79±0,11	<b>0,14</b>
	0,75 ng	77,88; 77,99	77,94; 77,93	78,03; 77,95	77,95±0,05	<b>0,06</b>
	75 pg	77,9; 78,05	78,0; 77,98	77,96; 77,93	77,97±0,05	<b>0,06</b>
	7,5 pg	77,89; 78,12	78,21; 78,07	77,92; 78,03	78,04±0,12	<b>0,15</b>
	0,75 pg	77,88; 77,91	78,09; 77,96	78,07; 77,98	78,15±0,47	<b>0,6</b>
	75 fg	77,9; 77,93	77,91; 77,94	77,89; 77,9	77,91±0,02	<b>0,03</b>
	T <sub>m</sub> átlag ±SD	77,92±0,11	77,95±0,15	77,95±0,06		
<b>Panel_7 variancia (%)</b>	<b>0,14</b>	<b>0,19</b>	<b>0,08</b>			
					<b>Összesített variancia (%) a standard sorok között: 0,11</b>	
		<b>Std. panel_1 % C.V.: 0,13</b>	<b>Std. panel_2 % C.V.: 0,14</b>	<b>Std. panel_3 % C.V.: 0,08</b>		

## 6.7 A MycoAnalyzer kiértékelő szoftver

Kifejlesztésre került egy olyan applikáció (MycoAnalyzer), amely a HRM PCR eredmények felhasználóbarát és gyors kiértékelését teszi lehetővé. A program a  $T_m$  és a  $C_q$  értékek megadását követően automatikusan elvégzi a mintában található *Aspergillus* vagy *Candida* gombafaj azonosítását az előre betáplált referencia értékek alapján. A *Candida* HRM esszé esetében lehetőség van a PCR készülék kiválasztására (LightCycler® 96, LightCycler® 2.0, LightCycler® Nano), ekkor az applikáció figyelembe veszi a hőmérséklet eltolódásokat, amely alapján korrekciót végez. Tetszőleges számú minta adható meg, amelyekhez egyedi mintaazonosítók rendelhetők. A program a „Submit” gomb lenyomásával indítható, az eredményeket a „Result” oszlopban olvashatja le a felhasználó. Sikeres fajazonosítás esetén a mintasor zöld színekódot kap, és a program kiírja az azonosított faj nevét. Amennyiben a megadott olvadási hőmérséklet nem szerepel a referencia értékek között, a mintasor piros színekódot kap, és „Not identified *Aspergillus/Candida* species” üzenet jelenik meg. Magas ciklusszám ( $C_q > 40$ ) esetében a mintasor sárga színekóddal figyelmezteti a felhasználót (21. ábra).



#	Sample ID	Tm	Cq	Result	
1	Sample_1	78.53	28	Candida albicans	
2	Sample_2	84	27	Not identified Candida species	Delete
3	Sample_3	81.34	22	Candida glabrata	Delete
4	Sample_4	81.34	55	Cq value too high	Delete

**21. ábra: MycoAnalyzer HRM kiértékelő applikáció.** Az alkalmazás ezen a linken keresztül tölthető le: <https://drive.google.com/drive/folders/1cOgfnW7aVH4d8atIyuE6rAltIcCToy1?usp=sharing>

## 7. Megbeszélés

A humánpatogén gombák gyors és megbízható faji szintű azonosítása napjainkban is komoly kihívást jelent a mikrobiológiai diagnosztikai laborok számára. A gombatenyészetek fenotípus vagy biokémiai jegyek alapján történő karakterizálása időigényes és komplex feladat, ezért nagy igény mutatkozik ezen a területen új, gyors és fajalapú molekuláris diagnosztikai módszerek fejlesztése iránt. A gombadiagnosztikában az idő kulcsfontosságú, ugyanis például a candidémiához köthető mortalitás a fertőzést követő 12 órában akár 20%-al is növekedhet, amennyiben nem kezdik meg a kezelést (**Morrell és mtsai. 2005**).

Az invazív mikózisok jelentős százaléka továbbra is az *Aspergillus* és *Candida* nemzetségekhez köthető, azonban a fő kórokozónak számító *Aspergillus fumigatus* illetve *Candida albicans* előfordulása csökkenő tendenciát mutat (**Salah és mtsai. 2019; Sanches és mtsai. 2019**). Az invazív gombafertőzések legfőbb rizikófaktora az immunszuppresszió, de a technológiai fejlődésnek köszönhető új életmentő orvosi beavatkozások következményeként a gombafertőzések száma továbbra is jelentősen növekszik, és egyre több gombafaj kimutatása válik szükségessé (**Wickes és Wiederhold 2018**). Az *Aspergillus terreus*, amely mára a harmadik leggyakrabban előforduló invazív aszpergillózist okozó gombapatogénként ismert, sok esetben elsődleges amphotericin B rezisztenciával rendelkezik (**Zoran és mtsai. 2018; Posch és mtsai. 2018**). Egy 2004 és 2008 között végzett epidemiológiai tanulmányban megállapították, hogy 5036 candidémiával diagnosztizált beteg közül az esetek közel felében (49,6%) non-*albicans* eredetű fertőzést volt kimutatható, amelyek jelentős százalékában *Candida glabrata*-t azonosítottak (**Pfaller és mtsai. 2014**). A gombafajok eltérő virulenciája és az antifungális szer érzékenységük miatt a fajalapú diagnózis kulcsfontosságú (**Romero és mtsai. 2019**). A *Candida* nemzetségen belül már annyira gyakori az antifungális rezisztencia előfordulása, hogy több faj is szerepel a WHO (World Health Organization) és a CDCA (Centers for Disease Control Antibiotic) kockázati listáján (**World Health Organization 2014; Centers for Disease Control and Prevention 2019**). A PCR technikák könnyű kivitelezhetőségük, gyorsaságuk, magas szenzitivitásuk és alacsony költségük miatt jól illeszkednek a gombadiagnosztikába (**Wickes és Wiederhold 2018**). A HRM PCR módszereket a szekvenálás alternatívájaként már sikeresen alkalmazzák baktériumtenyészetek gyors, költséghatékony faji szintű azonosítására (**Tamburro és Ripabelli 2017**).

Ph.D. munkám során nagyfelbontású olvadási görbe (HRM) alapú gombadiagnosztikai PCR esszék kidolgozásában vettem részt, amelyek 14 klinikailag releváns *Aspergillus* és *Candida* gombafaj genetikai elkülönítésére bizonyultak alkalmasnak. Ezen módszerek egyik előnye, hogy a PCR reakció során keletkező amplikonok egyedi fajspecifikus olvadási mintázata alapján végezzük a fajmeghatározást. Emiatt a fajazonosításhoz nincs szükség a génszekvencia pontos ismeretére, és nem alkalmazunk szekvencia specifikus próbákat sem.

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

Az invazív gombás fertőzések kimutatására irányuló gombadiagnosztikai PCR tesztek a vérből történő direkt patogén kimutatásra összpontosítanak. Ennek oka egyrészt a módszerhez köthető magas szenzitivitás és negatív prediktív érték (amennyiben a beteg nem részesül antifungális prophylaxisban), másfelől pedig több tanulmány is alátámasztja, hogy a gomba nukleinsavak előbb

jelennek meg a véráramban, mint például a galaktomannán (**Cuenca-Estrella és mtsai. 2009; Meije és mtsai. 2011**). Ez lehetővé teszi az invazív aszpergillózis igazolását még GM pozitivitás és a klinikai tünetek megjelenése előtt. **Egger és mtsai** 2020-ban megjelent közleménye átfogó, objektív képet ad ebben a témában, azonban már a klasszikus western-film analógiáját követő cím („Blood Aspergillus: The Good, the Bad and the Ugly”) is találóan szemlélteti, hogy a fent említett erősségek mellett a korlátozó tényezőket is figyelembe kell venni. Ezek közül kiemelendő, hogy vérminták esetében az antifungális prophylaxis jelentősen csökkenti a PCR tesztek diagnosztikai hatékonyságát. A legtöbb egészségügyi centrum amely hematológiai daganatos megbetegedések kezelésével foglalkozik, a főbb nemzetközi irányelvek ajánlására az antifungális profilaktikus terápiás megközelítést alkalmazza (**Cornely és mtsai. 2007; Lenczuk és mtsai. 2018**). Az antifungális prophylaxis és az intenzív immunszuppresszív terápiák következményeként a nem *Aspergillus* eredetű penészgombák előfordulása egyre gyakoribb a klinikumban. Emiatt fontos, hogy a PCR diagnosztikai esszék magas analitikai specificitással rendelkezzenek, és képesek legyenek különbséget tenni több *Aspergillus* faj között, ugyanakkor más penészgombákkal ne mutassanak keresztreakciót. Ez azért lényeges, mert a nem *Aspergillus* eredetű fertőzések eltérő antifungális kezelést igényelhetnek, illetve egyes *Aspergillus* fajok már eleve polién vagy azol rezisztenciával rendelkezhetnek (**Van Der Linden és mtsai. 2011**).

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

A fajazonosítás mellett az antifungális rezisztenciamechanizmusokhoz köthető génmutációk azonosítása is kiemelt fontosságú. A kereskedelmi forgalomban kapható tesztek (AsperGenius, MycoGenie) kizárólag a *Cyp51A* génen belüli azol rezisztencia markerek azonosítására alkalmasak (**Rath és Steinmann 2018**), ugyanakkor például polién (amphotericin B) rezisztenciáról nem



adnak tájékoztatást. A HRM módszerek kellően érzékenyek a különböző polimorfizmusok kimutatására, és antifungális rezisztens gombatörzsek azonosítására. Az *ERG11* génmutációhoz köthető azol rezisztens *Candida albicans* törzsek kiszűrésére már sikeresen alkalmazzák a HRM technikát (Caban és mtsai. 2016). A MALDI-TOF tömegspektrometria szintén nagyon gyors és hatékony a gombák faji szintű azonosításában, de limitáló tényező, hogy a meghatározás jelenleg csak tiszta tenyészetekből lehetséges, ami napokkal is eltolhatja a diagnózist (Clark és mtsai. 2013). A PCR módszerek előnye, hogy patogén kimutatás közvetlenül a klinikai mintákból (szövet, vér, BAL) is lehetséges, azonban a PCR inhibícióból következő álnegatív vagy a környezeti kontaminációból adódó álpozitív eredmények ellenőrzésére különösen a gombadiagnosztikai esszék esetén különösen nagy gondot kell fordítani (Alanio és Bretagne 2014). Az ubikviter gombák esetében gyakoriak a laborkontaminációból eredő álpozitív eredmények (Barnes és White 2016). Emiatt a DNS kinyerés során használt reagensek tisztaságát megfelelő izolációs kontroll beiktatásával ellenőrizzük, és a PCR reakciók esetében is használunk negatív kontrollokat.

Az *Aspergillus* és *Candida* HRM PCR módszerek kidolgozásakor figyelembe vettük a költséghatékonyságot, egyszerű kivitelezhetőséget és reprodukálhatóságot a nemzetközi irányelveknek megfelelően (Consortium OPATHY és Gabaldón 2019). A gombadiagnosztikai HRM PCR módszerek rutin felhasználását támogatva létrehoztam egy online kiértékelő alkalmazást (MycoAnalyzer), amely felhasználóbarát módon teszi lehetővé a minták elemzését. A dolgozatban leírttól eltérő mintafeldolgozás vagy PCR készülék alkalmazása esetén az olvadási hőmérséklet eltolódása miatt szükséges referencia gombatörzsekkel a rendszer újra kalibrálása. Ebben az esetben azonban a MycoAnalyzer szoftver nem alkalmazható az eredmények kiértékeléséhez. A HRM PCR teszt jól kombinálható más diagnosztikai módszerekkel is anélkül, hogy a költségeket jelentősen megemelné.

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

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

## 8. Összefoglalás

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

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

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

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

## 9. Summary

Our primary aim was to develop and optimize HRM PCR fungal diagnostic assays that allow genetic distinction of clinically relevant *Aspergillus* and *Candida* species. We identified regions in the  $\beta$ -*tubulin* genes of these two genera, which proved to be diverse enough in sequence to serve as unique species specific genetic fingerprints in HRM analysis. Based on this finding we managed to identify reference melting temperature ranges in case of *Aspergillus fumigatus*, *A. lentulus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. welwitschiae*, *A. tubingensis* and by using another *Candida* genus specific assay we can discriminate between *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* and *C. guilliermondii* species. The HRM PCR reaction parameters were optimized experimentally. The *Aspergillus* HRM PCR assay was validated on the Roche LightCycler® 96 instrument while the *Candida* HRM assay was optimized for three different Roche PCR platforms (LightCycler® 96, LightCycler® 2.0, LightCycler® Nano).

Altogether the analytical sensitivity of the *Aspergillus* HRM assay proved to be 100 GE, however, the *Candida* HRM assay was generally more sensitive (LoD: 10 GE), except in the case of the *Candida parapsilosis* (LoD: 100 GE). The assay accuracy and reproducibility above the detection limit was statistically confirmed.

To improve the routine use of our method, we designed a complete fungal diagnostic protocol including cell disruption, fungal DNA isolation, HRM PCR working protocol and interpretation of the results. The MycoAnalyzer online application was developed in order to achieve fast and user friendly species identification from the HRM PCR results. Our HRM PCR tests can be used in combination with other diagnostic methods without increasing the costs significantly.

Based on its simplicity, fast turn-around time and cost-effectiveness our method may be a viable alternative for clinical microbiology laboratories in species identification of *Aspergillus* and *Candida* cultures isolated from patients.

## 10. Irodalomjegyzék

- Aguardo JM**, Vázquez L, Fernández-Ruiz M és mtsai. Serum galactomannan versus a combination of galactomannan and polymerase chain reaction-based *Aspergillus* DNA detection for early therapy of invasive aspergillosis in high-risk hematological patients: a randomized controlled trial. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, 60:405-414. doi:10.1093/cid/ciu833
- Aimanianda V**, Bayry J, Bozza S és mtsai. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* **2009**, 460:1117-1121. doi:10.1038/nature08264
- Alanio A**, és Bretagne S. Difficulties with molecular diagnostic tests for mould and yeast infections: where do we stand? *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, 20 Suppl. 6:36–41. doi:10.1111/1469-0691.12617
- Alastruey-Izquierdo A**, Mellado E és Cuenca-Estrella M. Current section and species complex concepts in *Aspergillus*: recommendations for routine daily practice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2012**, 1273, 18–24. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06822.x
- Alcazar-Fuoli L**, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52:1244-1251. doi:10.1128/AAC.00942-07
- Anciones C**, de Felipe A, de Albóniga-Chindurza A és mtsai. Acute Stroke as First Manifestation of Cerebral Aspergillosis. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* **2018**, 27:3289-3293. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.07.031
- Andersen K-M**, Kristoffersen AK, Ingebertsen A. és mtsai. Diversity and antifungal susceptibility of Norwegian *Candida glabrata* clinical isolates. *J. Oral Microbiol.* **2016**, 8. doi:10.3402/jom.v8.29849
- Arendrup M**, Horn T és Frimodt-Møller N. *In vivo* pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. *Infection* **2002**, 30:286-291. doi:10.1007/s15010-002-2131-0
- Arendrup MC**. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clinical Microbiology and Infection* **2014**, 20:42-48. doi:10.1111/1469-0691.12513
- Ascioglu S**, Rex JH, de Pauw B és mtsai. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, 34:7-14. doi:10.1086/323335
- Aubry A**, Porcher R, Bottero J és mtsai. Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus* galactomannan test results following treatment with beta-lactam antibiotics in patients with hematological disorders. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, 44:389-94. doi:10.1128/JCM.44.2.389-394.2006

- Balajee SA**, Houbraken J, Verweij EP és mtsai. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Stud. Mycol.* **2007**, 59:39-46. doi:10.3114/sim.2007.59.05
- Balajee SA**, Borman AM, Brandt ME és mtsai. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *fusarium*, and *mucorales* species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? *J. Clin. Microbiol.* **2009**, 47:877-884. doi:10.1128/JCM.01685-08
- Balázs A**, Pócsi I, Hamari Zs és mtsai. AtfA bZIP-type transcription factor regulates oxidative and osmotic stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Genet. Genomics* **2010**, 283:289-303. doi:10.1007/s00438-010-0513-z.
- Barnes RA** és White PL. PCR Technology for Detection of Invasive Aspergillosis. *J. Fungi (Basel)* **2016**, 2(3):23. doi:10.3390/jof2030023
- Barton RC**. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: from diagnosis to prediction of outcome. *Scientifica (Cairo)* **2013**, 459405. doi:10.1155/2013/459405
- Beauvais A** és Latgé J-P. *Aspergillus* Biofilm *In Vitro* and *In Vivo*. *Microbiol. Spectr.* **2015**, 3. doi:10.1128/microbiolspec. MB-0017-2015.
- Benedict K**, Richardson M, Vallabhaneni S, Jackson BR, Chiller T. Emerging issues, challenges, and changing epidemiology of fungal disease outbreaks. *Lancet. Infect. Dis.* **2017**, 17:e403-e411. doi:10.1016/S1473-3099(17)30443-7
- Berger S**, El Chazli Y, Babu AF, Coste AT. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: A Consequence of Antifungal Use in Agriculture? *Front. Microbiol.* **2017**, 8:1024. doi:10.3389/fmicb.2017.01024
- Biswas C**, Chen SC-A, Halliday C és mtsai. Whole genome sequencing of *Candida glabrata* for detection of markers of antifungal drug resistance. *J. Vis. Exp.* **2017**, 130: e56714. doi:10.3791/56714
- Bongomin F**, Gago S, Oladele RO és Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases- Estimate Precision. *J.Fungi (Basel)* **2017**, 3:e57. doi:10.3390/jof3040057
- Botschuijver S**, Roeselers G, Levin E és mtsai. Intestinal Fungal Dysbiosis Is Associated With Visceral Hypersensitivity in Patients With Irritable Bowel Syndrome and Rats. *Gastroenterology* **2017**, 153:1026-1039. doi:10.1053/j.gastro.2017.06.004
- Brodoefel H**, Vogel M, Hebart H és mtsai. Long-term CT follow-up in 40 non-HIV immunocompromised patients with invasive pulmonary aspergillosis: kinetics of CT morphology and correlation with clinical findings and outcome. *Am. J. Roentgenol.* **2006**, 187:404-413. doi: 10.2214/AJR.05.0513
- Brown GD**, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG és White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Sci. Transl. Med.* **2012**, 4:165rv13. doi:10.1126/scitranslmed.3004404
- Caban M**, Strapagiel D, Dziadek J, Korycka-Machała M és Grzelak A. Principles of a New Protocol for Prediction of Azole Resistance in *Candida albicans* Infections on the Basis of

ERG11 Polymorphisms. *Curr. Microbiol.* **2016**, 73:172–182. doi:10.1007/s00284-016-1039-3

**Caporaso** JG, Kuczynski J, Stombaugh J és mtsai. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* **2010**, 7:335-336. doi:10.1038/nmeth.f.303

**Cassagne** C, Cella AL, Suchon P és mtsai. Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. *Med. Mycol.* **2013**, 51:371-377. doi:10.3109/13693786.2012.720720

**Cassagne** C, Normand AC, L'Ollivier C, Ranque S és Piarroux R. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. *Mycoses* **2016**, 59:678-690. doi:10.1111/myc.12506

**Cavalheiro** M és Teixeira MC. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges and Promising Strategies. *Front. Med. (Lausanne)* **2018**, 5:28. doi:10.3389/fmed.2018.00028

**Centers for Disease Control and Prevotion.** Antibiotic resistance threats in the United States. **2019**, url: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>

**Chong** GM, Maertens JA, Lagrou K, Driessen GJ, Cornelissen JJ, Rijnders BJ. Diagnostic performance of galactomannan antigen testing in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* **2016a**, 54:428-431. doi: 10.1128/JCM.02913-15

**Chong** G, van der Beek MT, von dem Borne A és mtsai. PCR-based detection of *Aspergillus fumigatus* *Cyp51A* mutations on bronchoalveolar lavage: a multicentre validation of the AsperGenius assay® in 201 patients with haematological disease suspected for invasive aspergillosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016b**, 71:3528-3535. doi:10.1093/jac/dkw323

**Clark** AE, Kaleta EJ, Arora A és Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, 26:547–603. doi:10.1128/CMR.00072-12

**Cleveland** AA, Harrison LH, Farley MM és mtsai. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: results from population-based surveillance. *PLoS One* **2015**, 10:e0120452. doi:10.1371/journal.pone.0120452

**Consortium OPATHY** és Gabaldón T. Recent trends in molecular diagnostics of yeast infections: from PCR to NGS. *FEMS Microbiol. Rev.* **2019**, 43:517-547. doi:10.1093/femsre/fuz015

**Coombes** KR, Baggerly KA és Morris JS. Pre-Processing Mass Spectrometry Data. *Fundamentals of Data Mining in Genomics and Proteomics* **2007**, 79-102. doi:10.1007/978-0-387-47509-7\_4

**Coumo** Ca. Harnessing Whole Genome Sequencing in Medical Mycology. *Curr. Fungal Infect. Rep.* **2017**, 11:52-59. doi:10.1007/s12281-017-0276-7

- Cornely OA**, Maertens J, Winston DJ és mtsai. Posaconazole vs. Fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N. Engl. J. Med.* **2007**, 356:348-359. doi:10.1056/NEJMoa061094
- Cuenca-Estrella M**, Meije Y, Diaz-Pedroche C, Gomez-Lopez A és mtsai. Value of serial quantification of fungal DNA by a real-time PCR based technique for early diagnosis of invasive aspergillosis in patients with febrile neutropenia. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, 47:379-384. doi:10.1128/JCM.01716-08
- Cuenca-Estrella M**, Bassetti M, Lass-Flörl C, Rácil Z, Richardson M és Rogers TR. Detection and investigation of invasive mould disease. *J. Antimicrob. Chemother.* **2011**, 66 Suppl. 1:i15-24. doi:10.1093/jac/dkq438
- Czurda S**, Smelik S, Preuner-Stix S, Noqueira F, Lion T. Occurrence of Fungal DNA Contamination in PCR Reagents: Approaches to Control and Decontamination. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, 54:148-152. doi: 10.1128/JCM.02112-15
- Dannaoui E**, Gabriel F, Gaboyard M és mtsai. Molecular Diagnosis of Invasive Aspergillosis and Detection of Azole Resistance by a Newly Commercialized PCR Kit. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, 55:3210-3218. doi:10.1128/JCM.01032-17
- Dark P**, Wilson C, Blackwood B és mtsai. Accuracy of LightCycler® SeptiFast for the detection and identification of pathogens in the blood of patients with suspected sepsis: a systematic review protocol. *BMJ Open* **2012**, 2:e000392. doi:10.1136/bmjopen-2011-000392
- Davies G**, Rolle A-M, Maurer A és mtsai. Towards Translational ImmunoPET/MR Imaging of Invasive Pulmonary Aspergillosis: The Humanised Monoclonal Antibody JF5 Detects Aspergillus Lung Infections *In Vivo*. *Theranostics* **2017**, 7:3398-3414. doi:10.7150/thno.20919
- De Carolis E**, Hensgens LAM, Vella A és mtsai. Identification and typing of the *Candida parapsilosis* complex: MALDI-TOF MS vs. AFLP. *Med. Mycol.* **2014**, 52:123-130. doi:10.1093/mmy/myt009
- De Pauw B**, Walsh TJ, Donnelly JP és mtsai. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, 46:1813-1821. doi:10.1086/588660
- Debode F**, Marien A, Janssen É, Bragard C és Berben G. The influence of amplicon length on real-time PCR results. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2017**, 21:3-11.
- Delaloye J** és Calandra T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence* **2014**, 5:161-169. doi:10.4161/viru.26187

- Dib** RW, Hachem RY, Chaftari A-M, Ghaly F, Jiang Y és Raad I. Treating invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancy: diagnostic-driven approach versus empiric therapies. *BMC Infect. Dis.* **2018**, 18:656. doi:10.1186/s12879-018-3584-9
- Didehdar** M, Khansarinejad B, Amirrajab N és Shokohi T. Development of a high-resolution melting analysis assay for rapid and high-throughput identification of clinically important dermatophyte species. *Mycoses* **2016**, 59:442-449. doi:10.1111/myc.12492
- Donnelly** JP, Chen SC, Kauffman CA és mtsai. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin. Infect. Dis.* **2019**, doi:10.1093/cid/ciz1008.
- Druml** B és Cichna-Markl M. High resolution melting (HRM) analysis of DNA-- its role and potential in food analysis. *Food Chem.* **2014**, 158:245-254. doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.111
- Duyvejonck** H, Cools P, Dercuyenaere J és mtsai. Validation of High Resolution Melting Analysis (HRM) of the Amplified ITS2 Region for the Detection and Identification of Yeasts from Clinical Samples: Comparison with Culture and MALDI-TOF Based Identification. *PLoS One* **2015**, 10:e0132149. doi: 10.1371/journal.pone.0132149
- Egger** M, Jenks JD, Hoenigl M, Prattes J. Blood *Aspergillus* PCR: The Good, the Bad and the Ugly. *J. Fungi (Basel)* **2020**, 6:18. doi:10.3390/jof6010018
- Erali** M, Voelkerding KV és Wittwer CT. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp. Mol. Pathol.* **2008**, 85:50-58. doi:10.1016/j.yexmp.2008.03.012
- Filler** SG és Sheppard DC. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS Pathog.* **2006**, 2:e129. doi:10.1371/journal.ppat.0020129
- Fisher** MC, Hawkins NJ, Sanglard D, Gurr SJ. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science* **2018**, 360:739-742. doi: 10.1126/science.aap7999
- Forsberg** K, Woodworth K, Walters M és mtsai. *Candida auris*: The recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. *Med. Mycol.* **2019**, 57:1-12. doi:10.1093/mmy/myy054
- Gadea** I, Cuenca-Estrella M, Martín E és mtsai. Microbiological procedures for diagnosing mycoses and for antifungal susceptibility testing. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2007**, 25:336-340. doi:10.1157/13102270
- Gdanetz** K, Benucci GMN, Vande Pol N és Bonito G. CONSTAX: a tool for improved taxonomic resolution of environmental fungal ITS sequences. *BMC Bioinf.* **2017**, 18:538. doi:10.1186/s12859-017-1952-x
- Goudjil** S, Kongolo G, Dusol L és mtsai. (1-3)- $\beta$ -D-glucan levels in candidiasis infections in the critically ill neonate. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **2013**, 26:44-48. doi:10.3109/14767058.2012.722716



- Guinea J**, Padilla C, Escribano P és mtsai. Evaluation of MycAssay™ *Aspergillus* for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Patients without Hematological Cancer. *PLoS One* **2013**, 8:e61545. doi:10.1371/journal.pone.0061545
- Guinea J**, Zaragoza O, Escribano P és mtsai. Molecular identification and antifungal susceptibility of yeast isolates causing fungemia collected in a population-based study in Spain in 2010 and 2011. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, 58:1529-37. doi: 10.1128/AAC.02155-13
- Guzman JA**, Tchokonte R és Sobel JD. Septic shock due to candidemia: outcomes and predictors of shock development. *J. Clin. Med. Res.* **2011**, 3:65-71. doi:10.4021/jocmr536w
- Hamer EC**, Moore CB, Denning DW. Comparison of two fluorescent whiteners, Calcofluor and Blankophor, for the detection of fungal elements in clinical specimens in the diagnostic laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* **2006**, 12:181-184. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01321.x
- Harrison E**, Stahlberger T, Whelan R és mtsai. *Aspergillus* DNA contamination in blood collection tubes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2010**, 67:392-394. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.02.028
- Hayes GE** és Novak-Frazer L. Chronic Pulmonary Aspergillosis—Where are we? and Where Are We Going? *J. Fungi (Basel)* **2016**, 2:18. doi:10.3390/jof2020018
- Healey KR**, Jimenez Ortigosa C, Shor E és Perlin DS. Genetic Drivers of Multidrug Resistance in *Candida glabrata*. *Front. Microbiol.* **2016**, 7:1995. doi:10.3389/fmicb.2016.01995
- Heaton SM**, Weintrob AC, Downing K. Histopathological techniques for the diagnosis of combat-related invasive fungal wound infections. *BMC Clin. Pathol.* **2016**, 16:11. doi:10.1186/s12907-016-0033-9
- Heinz WJ**, Buchheidt D, Christopeit M és mtsai. Diagnosis and empirical treatment of fever of unknown origin (FUO) in adult neutropenic patients: guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Medical Oncology (DGHO). *Ann. Hematol.* **2017**, 96:1775-1792. doi:10.1007/s00277-017-3098-3
- Heldt S** és Hoenigl M. Lateral Flow Assay for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis: Current Status. *Curr. Fungal Infect. Rep.* **2017**, 11:45-51. doi:10.1007/s12281-017-0275-8
- Herrmann MG**, Durtschi JD, Wittwer CT és Voelkerding KV. Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. *Clin. Chem.* **2007**, 53:1544-1548. doi:10.1373/clinchem.2007.088120
- Hibbett DS**, Ohman A, Glotzer D, Nuhn M, Kirk P és Nilsson RH. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews* **2011**, 25:38-47. doi:10.1016/j.fbr.2011.01.001
- Hof H**, Eigner U, Maier T és mtsai. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* by means of MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin. Lab.* **2012**, 58:927-931.

- Hokken** MWJ, Zwaan BJ, Melchers WJG és Verweij PE. Facilitators of adaptation and antifungal resistance mechanisms in clinically relevant fungi. *Fungal Genet. Biol.* **2019**,132:103254. doi:10.1016/j.fgb.2019.103254
- Holzheimer** RG és Dralle H. Management of mycoses in surgical patients -- review of the literature. *Eur. J. Med. Res.* **2002**, 7:200-226.
- Hope** WW, Kruhlak MJ, Lyman CA és mtsai. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* and the kinetics of galactomannan in an *in vitro* model of early invasive pulmonary aspergillosis: implications for antifungal therapy. *J. Infect. Dis.* **2007**, 195:455-466. doi:10.1086/510535
- Howard** SJ, Cerar D, Anderson MJ és mtsai. Frequency and Evolution of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Associated with Treatment Failure. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, 15:1068-1076. doi:10.3201/eid1507.090043
- Jones** AM, Horsley A és Denning DW. What is the importance of classifying *Aspergillus* disease in cystic fibrosis patients? *Expert Rev. Respir. Med.* **2014**, 8:389-392. doi:10.1586/17476348.2014.915751
- Kaya** S, Gençalioglu E, Sönmez M, Köksal I. The importance of risk factors for the prediction of patients with invasive pulmonary aspergillosis. *Revista da Associação Médica Brasileira* **2017**, 63:764-770. doi:10.1590/1806-9282.63.09.764
- Kingsbury** JM, Heitman J és Pinnell SR. Calcofluor white combination antifungal treatments for *Trichophyton rubrum* and *Candida albicans*. *PLoS One* **2012**, 7: e39405. doi:10.1371/journal.pone.0039405
- Klimek-Ochab** M, Brzezińska-Rodak M, Żyłańczyk-Duda E, Lejczak B és Kafarski P. Comparative study of fungal cell disruption—scope and limitations of the methods. *Folia Microbiol. (Praha)* **2011**, 56:469-475. doi:10.1007/s12223-011-0069-2
- Knutsen** AP és Slavin RG. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in asthma and cystic fibrosis. *Clin. Dev. Immunol.* **2011**, 843763. doi:10.1155/2011/843763
- Kocsubé** S, Perrone G, Magistà D és mtsai. *Aspergillus* is monophyletic: Evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. *Stud. Mycol.* **2016**, 85:199-213. doi:10.1016/j.simyco.2016.11.006
- Koltze** A, Rath P, Schöning S és mtsai.  $\beta$ -D-Glucan screening for the detection of invasive fungal disease in children undergoing allogenic hematopoietic stem cell transplantation. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, 53:2605-2610. doi: 10.1128/JCM.00747-15
- Köljalg** U, Nilsson RH, Abarenkov K és mtsai. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol. Ecol.* **2013**, 22:5271-5277. doi:10.1111/mec.12481
- Kullberg** BJ, Arendrup MC. Invasive Candidiasis. *N. Engl. J. Med.* **2015**, 373:1445-1456. doi:10.1056/NEJMra1315399

- Lamoth F**, Lockhart SR, Berkow EL és Calandra T. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, 73:i4-i13. doi:10.1093/jac/dkx444
- Lass-Flörl C**. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* **2009**, 52:197-205. doi:10.1111/j.1439-0507.2009.01691.x
- Latgé JP**, Kobayashi H, Debeauvais JP és mtsai. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **1994**, 62:5424-5433.
- Lauruschkat CD**, Einsele H és Loeffler J. Immunomodulation as a Therapy for *Aspergillus* Infection: Current Status and Future Perspectives. *J. Fungi (Basel)* **2018**, 4pii:E137. doi:10.3390/jof4040137
- Lehrnbecher T**, Hassler A, Groll AH és Bochenek K. Diagnostic Approaches for Invasive Aspergillosis-Specific Considerations in the Pediatric Population. *Front. Microbiol.* **2018**, 9:518. doi:10.3389/fmicb.2018.00518
- Lenczuk D**, Zinke-Cerwenka W, Greinix H és mtsai. Antifungal prophylaxis with posaconazole delayed-release tablet and oral suspension in a real-life setting: Plasma levels, e\_cacy, and tolerability. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, 62:e02655-17. doi:10.1128/AAC.02655-17
- Li Y-D**, Chu Z-Z, Liu X-G, Jing H-C, Liu Y-G és Hao D-Y. A cost-effective high-resolution melting approach using the EvaGreen dye for DNA polymorphism detection and genotyping in plants. *J. Integr. Plant. Biol.* **2010**, 52:1036-1042. doi:10.1111/j.1744-7909.2010.01001.x
- Libert X**, Packeu A, Bureau F, Roosens HN, De Keersmaecker SCJ. Discrimination of three genetically close *Aspergillus* species by using high resolution melting analysis applied to indoor air as case study. *BMC Microbiol.* **2017**, 17:84. doi:10.1186/s12866-017-0996-4
- Liu K-L**, Porrás-Alfaro A, Kuske CR, Eichorst SA és Xie G. Accurate, rapid taxonomic classification of fungal large-subunit rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, 78:1523-1533. doi:10.1128/AEM.06826-11
- Livério HO**, Ruiz L da S, Freitas RS és mtsai. Phenotypic and genotypic detection of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* strains isolated from oral mucosa of AIDS pediatric patients. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **2017**, 59:e14. doi:10.1590/S1678-9946201759014
- Loeffler J**, Hafner J, Mengoli C és mtsai. Prospective Biomarker Screening for Diagnosis of Invasive Aspergillosis in High-Risk Pediatric Patients. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, 55:101-109. doi:10.1128/JCM.01682-16
- Mandviwala T**, Shinde R, Kalra A, Sobel JD és Akins RA. High-Throughput Identification and Quantification of *Candida* Species Using High Resolution Derivative Melt Analysis of Panfungal Amplicons. *J. Mol. Diagn.* **2010**, 12:91-101. doi:10.2353/jmoldx.2010.090085
- Maschmeyer G**, Carratalà J, Buchheidt D és mtsai. Diagnosis and antimicrobial therapy of lung infiltrates in febrile neutropenic patients (allogeneic SCT excluded): updated guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Medical Oncology (DGHO). *Ann. Oncol.* **2015**, 26:21-33. doi:10.1093/annonc/mdu192

- McCarty TP** és **Pappas PG**. Invasive Candidiasis. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **2016**, 30:103-124. doi:10.1016/j.idc.2015.10.013
- Meije Y**, **Aguardo JM**, **Cuenca-Estrella M**. Silent and prolonged aspergillus dnaemia in oncohematological patients receiving antifungal prophylaxis: A new phenomenon with clinical implications. *Bone Marrow Transplant.* **2011**, 46:1016-7. doi:10.1038/bmt.2010.219
- Mennink-Kersten MASH**, **Donnelly JP** és **Verweij PE**. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect. Dis.* **2004**, 4:349-357. doi:10.1016/S1473-3099(04)01045-X
- Mitsui C**, **Taniguchi M**, **Fukutomi Y** és **mtai**. Non occupational chronic hypersensitivity pneumonitis due to *Aspergillus fumigatus* on leaky walls. *Allergol. Int.* **2012**, 61:501–502. doi:10.2332/allergolint.12-LE-0421
- Moazeni M**, **Nabili M**, **Khodaveisy S** és **Badali H**. Molecular approaches to diagnosis of invasive aspergillosis; what we know and what we do not know. *Research in Molecular Medicine* **2013**, 1:3-9. doi:10.18869/acadpub.rmm.1.2.3
- Monheit JE**, **Cowan DF** és **Moore DG**. Rapid detection of fungi in tissues using calcofluor white and fluorescence microscopy. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **1984**, 108:616-618.
- Moodley L**, **Pillay J** és **Dheda K**. Aspergilloma and the surgeon. *J. Thorac. Dis.* **2014**, 6:202-209. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2013.12.40
- Morrell M**, **Fraser VJ** és **Kollef MH**. Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49:3640–3645. doi:10.1128/AAC.49.9.3640-3645.2005
- Mudhigeti NT**, **Dharmeswari C**, **Sheela P**, **Anitha K** és **Reba K**. Use of chromogenic medium for speciation of *Candida* isolated from clinical specimens. *Journal of Current Pharmaceutical Review and Research* **2014**, 6:1.
- Nadeem SG**, **Hakim ST** és **Kazmi SU**. Use of CHROMagar Candida for the presumptive identification of *Candida* species directly from clinical specimens in resource-limited settings. *Libyan J Med* **2010**, 5. doi:10.3402/ljm.v5i0.2144
- Nagy E**, **Ábrók M**, **Bartha N** és **mtsai**. Mátrix-asszisztált lézer deszorpciós, ionizációs, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria speciális alkalmazása a klinikai mikrobiológiai diagnosztika területén | Special application of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiological diagnostics. *Orvosi Hetilap* **2014**, 155:1495-1503.
- Naselli A**, **Faraci M**, **Lanino E** és **mtsai**. Persistence of high-level (1,3)- $\beta$ -D-glucan after candidemia following autologous peripheral SCT in a pediatric patient. *Bone Marrow Transplant.* **2015**, 50:137-138. doi:10.1038/bmt.2014.206

- Nemcova E**, Cernochova M, Ruzicka F, Malisova B, Freiburger T és Nemec P. Rapid Identification of Medically Important *Candida* Isolates Using High Resolution Melting Analysis. *PLoS One* **2015**, 10:e0116940. doi:10.1371/journal.pone.0116940
- Neyaz Z**, Singh V, Mehrotra A és Jain M. Cerebral Aspergillosis Mimicking a Neoplasm in an Immunocompetent Patient. *Int. J. Appl. Basic. Med. Res.* **2018**, 8:269-271. doi:10.4103/ijabmr.IJABMR\_393\_17
- Nolan T**, Hands RE, Ogunkolade W, Bustin SA. SPUD: a quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. *Anal. Biochem.* **2006**, 351:308-310. doi:10.1016/j.ab.2006.01.051
- Odds FC** és Davidson A. „Room-temperature” use of CHROMagar *Candida*<sup>TM</sup>. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2000**, 38:147-50. doi: 10.1016/S0732-8893(00)00197-8
- Osei Sekyere J**. *Candida auris*: A systematic review and meta-analysis of current updates on an emerging multidrug-resistant pathogen. *Microbiologyopen* **2018**, 7:e00578. doi:10.1002/mbo3.578
- Oz Y** és Kiraz N. Diagnostic methods for fungal infections in pediatric patients: microbiological, serological and molecular methods. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2011**, 9:289-298. doi:10.1586/eri.10.168
- Pagano L**, Caira M, Cadnoni A és mtsai. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* **2006**, 91:1068-1075.
- Paholcsek M**, Fidler G, Konya J és mtsai. Combining standard clinical methods with PCR showed improved diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies and prolonged neutropenia. *BMC Infect. Dis.* **2015**, 15:251. doi:10.1186/s12879-015-0995-8
- Panse P**, Smith M, Cummings K, Jensen E, Gotway M és Jokerst C. The many faces of pulmonary aspergillosis: Imaging findings with pathologic correlation. *Radiology of Infectious Diseases* **2016**, 3:192-200. doi:10.1016/j.jrid.2016.10.002
- Pappas PG**, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L és Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat. Rev. Dis. Primers.* **2018**, 4:18026. doi:10.1038/nrdp.2018.26
- Perlin DS**, Rautemaa-Richardson R és Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms and management. *Lancet. Infect. Dis.* **2017**, e383-e392. e383–e392. doi:10.1016/S1473-3099(17)30316-X
- Petrik M**, Haas H, Dobrozemsky G és mtsai. <sup>68</sup>Ga-siderophores for PET imaging of invasive pulmonary aspergillosis: proof of principle. *J. Nucl. Med.* **2010**, 51:639-645. doi:10.2967/jnumed.109.072462
- Pfaller MA**, Andes DR, Diekema DJ és mtsai. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal

Therapy (PATH) registry 2004-2008. *PLoS One* **2014**, 9:e101510. doi:10.1371/journal.pone.0101510

**Pfeiffer** CD, Fine JP és Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, 42:1417-1427. doi:10.1086/503427

**Pfeiffer** CD, Samsa GP, Schell WA, Reller LB, Perfect JR, Alexander BD. Quantitation of *Candida* CFU in initial positive blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, 49:2879-83. doi:10.1128/JCM.00609-11

**Posch** W, Blatzer M, Wilflingseder D és Lass-Flörl C. *Aspergillus terreus*: Novel lessons learned on amphotericin B resistance. *Med. Mycol.* **2018**, 56:73-82. doi:10.1093/mmy/myx119

**Powers-Fletcher** MV és Hanson KE. Molecular Diagnostic Testing for *Aspergillus*. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, 54:2655-2660. doi:10.1128/JCM.00818-16

**Raja** HA, Miller AN, Pearce CJ és Oberlies NH. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *J. Nat. Prod.* **2017**, 80:756-770. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b01085

**Ramana** KV, Kandi SPVB, Sharada C. V és mtsai. Invasive fungal infections: A comprehensive review. *American Journal of Infectious Diseases and Microbiology* **2013**, 1:64-69. doi:10.12691/ajidm-1-4-2

**Rath** PM és Steinmann J. Overview of Commercially Available PCR Assay for the Detection of *Aspergillus spp.* DNA in Patient Samples. *Front. Microbiol.* **2018**, 9:740. doi:10.3389/fmicb.2018.00740

**Reischies** FMJ, Raggam RB, Prattes J és mtsai. Urine Galactomannan-to-Creatinine Ratio for Detection of Invasive Aspergillosis in Patients with Hematological Malignancies. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, 54:771-774. doi:10.1128/JCM.02969-15

**Richardson** M, Bowyer P, Sabino R. The human lung and *Aspergillus*: You are what you breathe in? *Med. Mycol.* **2019**, 57:S145-S154. doi:10.1093/mmy/myy149

**Rickerts** V, Mousset S, Lambrecht E és mtsai. Comparison of histopathological analysis, culture, and polymerase chain reaction assays to detect invasive mold infections from biopsy specimens. *Clin. Infect. Dis.* **2007**, 44:1078-83. doi:10.1086/512812

**Ririe** KM, Rasmussen RP és Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **1997**, 245:154-60. doi:10.1006/abio.1996.9916

**Roilides** E és Iosifidis E. Acquired resistance in fungi: how large is the problem? *Clin. Microb. and Inf.* **2019**, 7:790-791. doi:10.1016/j.cmi.2019.02.018

**Romero** M, Messina F, Marin E és mtsai. Antifungal Resistance in Clinical Isolates of *Aspergillus spp.*: When Local Epidemiology Breaks the Norm. *J. Fungi (Basel)* **2019**, 5:E41. doi:10.3390/jof5020041

- Ruhnke M**, Böhme A, Buchheidt D, Cornely O és mtsai. Diagnosis of invasive fungal infections in hematology and oncology--guidelines from the Infectious Diseases Working Party in Haematology and Oncology of the German Society for Haematology and Oncology (AGIHO). *Ann. Oncol.* **2012**, 23:823–833. doi:10.1093/annonc/mdr407
- Ruskova L** és Raclavsky V. The potential of high resolution melting analysis (hrma) to streamline, facilitate and enrich routine diagnostics in medical microbiology. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomuc Czech Repub.* **2011**, 155:239-252. doi:10.5507/bp.2011.045
- Sacarlal J** és Denning DW. Estimated Burden of Serious Fungal Infections in Mozambique. *J. Fungi (Basel)* **2018**, 4pii:E75. doi:10.3390/jof4030075
- Safavieh M**, Coarsey C, Esiobu N. Advances in *Candida* detection platforms for clinical and point-of-care applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2017**, 37:441-458. doi:10.3109/07388551.2016.1167667
- Salah H**, Lackner M, Houbraken J és mtsai. The Emergence of Rare Clinical *Aspergillus* Species in Qatar: Molecular Characterization and Antifungal Susceptibility Profiles. *Front. Microbiol.* **2019**, 10:1677. doi:10.3389/fmicb.2019.01677
- Samson RA**, Visagie CM, Houbraken J és mtsai. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* **2014**, 78:141-173. doi:10.1016/j.simyco.2014.07.004
- Sanches MD**, Mimura LAN, Oliveira LRC és mtsai. Differential Behavior of Non-albicans *Candida* Species in the Central Nervous System of Immunocompetent and Immunosuppressed Mice. *Front. Microbiol.* **2019**, 8:2968. doi:10.3389/fmicb.2018.02968
- Schmidt G**, Stiverson J, Angen Ø, Yu Z. Number of PCR Cycles and Magnesium Chloride Concentration Affect Detection of *tet* Genes Encoding Ribosomal Protection Proteins in Swine Manure. *Adv. in Microbiol.* **2014**, 4:780-787. doi:10.4236/aim.2014.412086
- Schoch CL**, Seifert KA, Huhndorf S és mtsai. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109:6241-6246. doi:10.1073/pnas.1117018109
- Schröder MS**, Vicente KM de S, Prandini THR és mtsai. Multiple origins of the pathogenic yeast *Candida orthopsilosis* by separate hybridizations between two parental species. *PLoS Genet.* **2016**, 12:e1006404. doi:10.1371/journal.pgen.1006404
- Sharma C**, Kumar R, Kumar N, Masih A, Gupta D és Chowdhary A. Investigation of Multiple Resistance Mechanisms in Voriconazole-Resistant *Aspergillus flavus* Clinical Isolates from a Chest Hospital Surveillance in Delhi, India. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, 62:e01928-17. doi:10.1128/AAC.01928-17
- Shen Y**, Zhang X, Lin W, Wan C, Li Q és Jiang Y. Liquid-based cytopathology test as novel method to identify *Aspergillus* in patients with pulmonary aspergillosis. *Sci. Rep.* **2017**, 7:1-8. doi:10.1038/s41598-017-07564-3

- Sidstedt** M, Hedman J, Romsos EL és mtsai. Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, 410:2569-2583. doi:10.1007/s00216-018-0931-z
- Simok** I. High-Resolution DNA Melting Analysis in Plant Research. *Trends Plant Sci.* **2016**, 21:528-537. doi:10.1016/j.tplants.2016.01.004
- Slany** M, Vanerkova M, Nemcova E és mtsai. Differentiation of *Staphylococcus spp.* by high-resolution melting analysis. *Can. J. Microbiol.* **2010**, 56:1040-1049. doi:10.1139/W10-091
- Slomka** M, Sobalska-Kwapis M, Wachulec M, Bartosz G és Strapagiel D. High Resolution Melting (HRM) for High-Throughput Genotyping-Limitations and Caveats in Practical Case Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18:2316. doi:10.3390/ijms18112316
- Somogyvari** F, Horvath A, Serly J és mtsai. Detection of invasive fungal pathogens by real-time PCR and high-resolution melting analysis. *In Vivo* **2012**, 26:979-983.
- Steer** PA, Kirkpatrick NC, O'Rourke D és Noormohammadi AH. Classification of fowl adenovirus serotypes by use of high-resolution melting-curve analysis of the hexon gene region. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, 47:311-321. doi:10.1128/JCM.01567-08
- Steinbach** WJ, Marr KA, Anaissie EJ és mtsai. Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. *J. Infect.* **2012**, 65:453-464. doi:10.1016/j.jinf.2012.08.003
- Stephens** AJ, Inman-Bamber J, Giffard PM és Huygens F. High-resolution melting analysis of the spa repeat region of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Chem.* **2008**, 54:432-436. doi:10.1373/clinchem.2007.093658
- Sudbery** P, Gow N és Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends. Microbiol.* **2004**, 12:317-324. doi:10.1016/j.tim.2004.05.008
- Sullivan** DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE és Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology (Reading, Engl.)* **1995**, 141 (Pt 7):1507-1521. doi:10.1099/13500872-141-7-1507
- Summerbell** RC, Lévesque CA, Seifert KA és mtsai. Microcoding: the second step in DNA barcoding. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2005**, 360:1897-1903. doi:10.1098/rstb.2005.1721
- Swoboda-Kopec** E, Sikora M, Piskorska K és mtsai. Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, 944:27-33. doi:10.1007/5584\_2016\_46
- Szigeti** G, Sedaghati E, Mahmoudabadi ZA és mtsai. Species assignment and antifungal susceptibilities of black aspergilli recovered from otomycosis cases in Iran. *Mycoses* **2012**, 55:333-338. doi:10.1111/j.1439-0507.2011.02103.x



- Tamburro M** és **Ripabelli G**. High Resolution Melting as a rapid reliable, accurate and cost-effective emerging tool for genotyping pathogenic bacteria and enhancing molecular epidemiological surveillance: a comprehensive review of the literature. *Annali di igiene medicina preventiva e di comunità* **2017**, 29:293-316. doi:10.7416/ai.2017.2153
- Tang SX**, **Moyes DL**, **Richardson JP**, **Blagojevic M** és **Naglik JR**. Epithelial discrimination of commensal and pathogenic *Candida albicans*. *Oral Dis.* **2016**, 22 Suppl. 1:114-119. doi:10.1111/odi.12395
- Thomaz DY**, **de Almeida JN**, **Lima GME** és **mtsai**. An Azole-Resistant *Candida parapsilosis* Outbreak: Clonal Persistence in the Intensive Care Unit of a Brazilian Teaching Hospital. *Front. Microbiol.* **2018**, 9:2997. doi:10.3389/fmicb.2018.02997
- Thornton CR**. Molecular Imaging of Invasive Pulmonary Aspergillosis Using ImmunoPET/MRI: The Future Looks Bright. *Front. Microbiol.* **2018**, 9:691. doi:10.3389/fmicb.2018.00691
- Tong SYC** és **Giffard PM**. Microbiological Applications of High-Resolution Melting Analysis. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, 50:3418-3421. doi:10.1128/JCM.01709-12
- Tsang CC**, **Tang JYM**, **Lau SKP** és **Woo PCY**. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era – Past, present and future. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2018**, 16:197-210. doi:10.1016/j.csbj.2018.05.003
- Tsui C**, **Kong EF** és **Jabra-Rizk MA**. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathog. Dis.* **2016**, 74: ftw018. doi:10.1093/femspd/ftw018
- Tulasidas S**, **Rao P**, **Bhat S** és **Manipura R**. A study on biofilm production and antifungal drug resistance among *Candida* species from vulvovaginal and bloodstream infections. *Infect. Drug Resist.* **2018**, 11:2443-2448. doi:10.2147/IDR.S179462
- Ullmann AJ**, **Aguado JM**, **Arikan-Akdagli S** és **mtsai**. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**, 24 Suppl 1:e1-e38. doi:10.1016/j.cmi.2018.01.002
- Van Der Linden JW**, **Warris A**, **Verweij PE**. *Aspergillus* species intrinsically resistant to antifungal agents. *Med. Mycol.* **2011**, 49 Suppl. 1:S82-9. doi:10.3109/13693786.2010.499916
- Vaz C**, **Sampaio P**, **Clemons KV**, **Huang Y-C**, **Stevens DA** és **Pais C**. Microsatellite multilocus genotyping clarifies the relationship of *Candida parapsilosis* strains involved in a neonatal intensive care unit outbreak. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2011**, 71:159-162. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.05.014
- Veses V** és **Gow NAR**. Pseudohypha budding patterns of *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **2009**, 47:268-275. doi:10.1080/13693780802245474
- Vu D**, **Groenewald M**, **de Vries M** és **mtsai**. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Stud. Mycol.* **2019**, 92:135-154. doi:10.1016/j.simyco.2018.05.001

- Vyzantiadis T-AA**, Johnson EM és Kibbler CC. From the patient to the clinical mycology laboratory: how can we optimise microscopy and culture methods for mould identification? *J. Clin. Pathol.* **2012**, 65:475-483. doi:10.1136/jclinpath-2011-200500
- Wagner K**, Springer B, Pires VP és Keller PM. Molecular detection of fungal pathogens in clinical specimens by 18S rDNA high-throughput screening in comparison to ITS PCR and culture. *Sci. Rep.* **2018**, 8:6964. doi:10.1038/s41598-018-25129-w
- Wang Y**, Chen L, Liu X és mtsai. Detection of *Aspergillus fumigatus* pulmonary fungal infections in mice with 99mTc-labeledMORF oligomers targeting ribosomal RNA. *Nucl. Med. Biol.* **2013**, 40:89-96. doi:10.1016/j.nucmedbio.2012.10.001
- Weymann D**, Laskin J, Roscoe R és mtsai. The cost and cost trajectory of whole-genome analysis guiding treatment of patients with advanced cancers. *Mol. Genet. Genomic Med.* **2017**, 5:251-260. doi:10.1002/mgg3.281
- White PL**, Jones T, Whittle K, Watkins J és Barnes RA. Comparison of Galactomannan Enzyme Immunoesszé Performance Levels when Testing Serum and Plasma Samples. *Clin. Vaccine Immunol.* **2013**, 20:636-638. doi:10.1128/CVI.00730-12
- Wickes BL** és Wiederhold NP. Molecular diagnostics in medical mycology. *Nat. Commun.* **2018**, 9:5135. doi:10.1038/s41467-018-07556-5
- Willinger B** és Manafi M. Evaluation of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida* species. *Mycoses* **1999**, 42:61-65. doi:10.1046/j.1439-0507.1999.00406.x
- Wittwer CT**, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG és Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin. Chem.* **2003**, 49:853-860. doi:10.1373/49.6.853
- World Health Organization**. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. **2014**, url: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/surveillancereport/en/>
- Xanthopoulou A**, Ganopoulos I, Tryfinopoulou P és mtsai. Rapid and accurate identification of black aspergilli from grapes using high-resolution melting (HRM) analysis. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, 99:309-314. doi:10.1002/jsfa.9189
- Yapar N**. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther. Clin. Risk. Manag.* **2014**, 10:95-105. doi:10.2147/TCRM.S40160
- Zarrinfar H**, Mirhendi H, Makimura K, Satoh K, Khodadadi H és Paknejad O. Use of mycological, nested PCR, and real-time PCR methods on BAL fluids for detection of *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* in solid organ transplant recipients. *Mycopathologia* **2013**, 176:377-385. doi:10.1007/s11046-013-9657-9
- Zhuang Q**, Ma H, Zhang Y és mtsai. Galactomannan in Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis with Nonneutropenic Patients. *Can. Respir. J.* **2017**, 3685261. doi:10.1155/2017/3685261

- Zmeili** OS és Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *QJM: Monthly J. Assoc. Phys.* **2007**, 100:317-334. doi:10.1093/qjmed/hcm035
- Zoll** J, Snelders E, Verweij PE és Melchers WJG. Next-Generation Sequencing in the Mycology Lab. *Curr. Fungal Infect. Rep.* **2016**,10:37-42. doi:10.1007/s12281-016-0253-6
- Zoran** T, Sartori B, Sappl L és mtsai. Azole-Resistance in *Aspergillus terreus* and Related Species: An Emerging Problem or a Rare Phenomenon? *Front. Microbiol.* **2018**, 9:516. doi:10.3389/fmicb.2018.00516

## 11. Köszönetnyilvánítás

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

Külön köszönet illeti **Dr. Leiter Évát (Debreceni Egyetem, Molekuláris Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék)**, **Dr. Kocsubé Sándort (Szegedi Tudományegyetem, Mikrobiológiai Tanszék)**, **Dr. Stágel Anikót (Roche Magyarország Kft)**, **Dr. Szabó Juditot (Debreceni Egyetem, Orvosi Mikrobiológia)**, **Dr. Majoros Lászlót (Debreceni Egyetem, Orvosi Mikrobiológia)** és **Dr. Varga Jánost (Szegedi Tudományegyetem, Mikrobiológiai Tanszék)** értékes szakmai segítségükért.

Köszönetet mondok minden korábbi és jelenlegi munkatársamnak.

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

## 12. Tárgyszavak

Invazív mikózis, *Aspergillus*, *Candida*, fajalapú diagnózis,  *$\beta$ -tubulin* gén, kvantitatív valós idejű PCR, nagyfelbontású olvadási görbe analízis, módszeroptimalizálás, gombadiagnosztikai protokoll

### **13. Keywords**

Invasive mycoses, *Aspergillus*, *Candida*, species based diagnosis,  $\beta$ -*tubulin* gene, quantitative real-time PCR, high resolution melting analysis, method optimization, fungal diagnostic protocol

# 14. Függelék – Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

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

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

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





### További közlemények

3. Biró, A., Markovics, A., Fazekas, M., **Fidler, G.**, Szalóki, G., Paholcsek, M., Lukács, J., Stündl, L., Gálné Remenyik, J.: Allithiamine Alleviates Hyperglycaemia-Induced Endothelial Dysfunction. *Nutrients*. 12 (6), 1-13, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/nu12061690>  
IF: 4.171 (2018)
4. **Fidler, G.**, Tolnai, E., Stágel, A., Gálné Remenyik, J., Stündl, L., Gál, F., Biró, S., Paholcsek, M.: Tendentious effects of automated and manual metagenomic DNA purification protocols on broiler gut microbiome taxonomic profiling. *Sci. Rep.* 10 (1), 1-16, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-60304-y>  
IF: 4.011 (2018)
5. Paholcsek, M., **Fidler, G.**, Kónya, J., Rejtő, L., Méhes, G., Bukta, E., Loeffler, J., Biró, S.: Combining standard clinical methods with PCR showed improved diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies and prolonged neutropenia. *BMC Infect. Dis.* 15 (1), 251, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-015-0995-8>  
IF: 2.69

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16,236**

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

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

Debrecen, 2020.06.24.

