

EGYETEMI DOKTORI (Ph. D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Majoros László

DEBRECENI EGYETEM ORVOS-ÉS EGÉSZSÉGÜGYI CENTRUM

ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

ORVOSI MIKROBIOLÓGIA INTÉZET

DEBRECEN

2005

Bevezetés

Candida fajok által okozott megbetegedések epidemiológiája

A sarjadzó gombák által okozott fertőzések az enyhe tünetekkel járó nyálkahártya fertőzésektől, a súlyos, életet veszélyeztető invazív fertőzésekig terjedhetnek. A fertőzések szoros összefüggésben vannak az invazív diagnosztikus és terápiás módszerek elterjedésével, a hosszan tartó, széles spektrumú antibiotikum kezeléssel, „új” betegcsoportok megjelenésével (AIDS), valamint a daganatok miatt kemoterápiában részesülő betegek tartósan neutropéniás állapotával.

Az 1990-es évek elejéig az invazív gombafertőzések közül gyakorlatilag csak a *C. albicans* volt izolálható. A preventív terápiára is kitűnően alkalmas, a betegek által nagyobb dózisban is jól tolerált flukonazol (FLU) bevezetése a napi rutinba visszaszorította a *C. albicans* okozta candidemiák számát, míg növekedett a nem-*C. albicans* Candidák okozta candidemiák száma. A FLU nagymértékű használata miatti szelekció elősegítette különféle antifungális szerek iránt többszörösen rezisztens *C. glabrata*, *C. tropicalis* és *C. krusei* fajok szerepének a növekedését az invazív kórfolyamatokban. A nem *C. albicans* Candidák által okozott halálozás betegcsoporttól függően (daganatos alapbetegség, tartós neutropénia, magas vagy alacsony életkor) akár a 40-80 %-t is elérheti.

Sarjadzó gombák diagnosztikája

Invazív gombafertőzések esetén a diagnosztika nagyon nehéz. A hemokultúráknak kevesebb, mint 50%-a pozitív csupán, egyéb testtájak esetén, pedig a kolonizáció és a valódi patogén szerep eldöntése sokszor problémás lehet. A klinikai kép alapján a neutropéniás, széles spektrumú antibiotikummal kezelt betegek esetén a perzisztáló láz negatív tenyésztési eredmény esetén is valószínűsíti az invazív gombafertőzést.

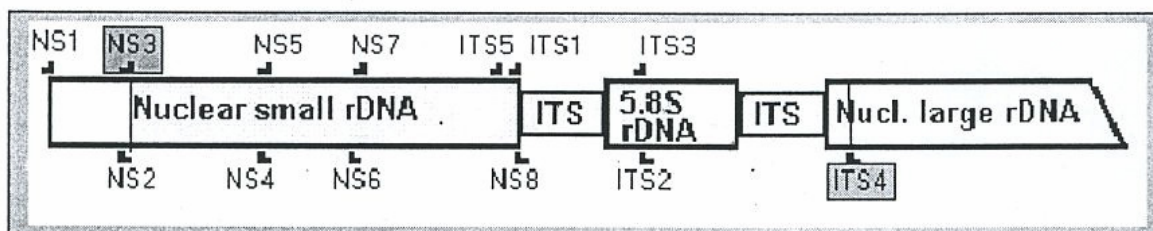
A rutin diagnosztikában a sarjadzó gombák azonosítását néhány egyszerű módszerrel az esetek többségében könnyen el lehet végezni. A csíratömlő vagy a klamidospóra karakterisztikus a *C. albicans* és a *C. dubliniensis* fajok esetén. A kevert tenyészetek felismerését nagymértékben megkönnyíti a CHROMagar Candida differenciáló táptalaj. A napjainkban igen elterjedt kereskedelmi tesztek a gombák

szénhidrát asszimilációs profilja alapján segítenek a faj meghatározásában (ID 32C vagy az API 20C), bár fajtól függően gyakori lehet a téves azonosítás.

Az invazív sarjadzó gomba fertőzések szerológiai diagnosztikájában, a sejtfalban található proteinek és szénhidrátok jöhetnek szóba. A vérben található mannán és az ellene termelt ellenanyag egyidejű kimutatása egyes tanulmányok szerint 93 %-s specifitással és 80 %-s érzékenységgel rendelkezik, így szerepe a közeljövőben növekedni fog az invazív gombafertőzések diagnosztikájában.

Napjainkban a DNS analízisen alapuló gyors, szenzitív és specifikus diagnosztikai eljárások egyre jobban előtérbe kerülnek. A rutin diagnosztikában is jól alkalmazható a restrikciós fragmenthossz polimorfizmus vizsgálati módszere (RFLP).

Az RFLP analízist, ha amplifikált rDNS darabokon végezzük el, ribotipizálásról beszélünk. A módszer genetikai alapja az, hogy a gombák riboszómális RNS (rRNS) génjei tandem módon ismétlődnek, minden ismétlődés tartalmazza a 18S, az 5.8S és a 26S rRNS génjeit. Két másik régió is megtalálható, melyet az előző szakaszok fognak közre: az internal transcribed spacer (ITS) régió és az intergenic spacer (IGS) régió. Az rRNS-t kódoló régiók bázissorrendjüket tekintve konzervatívak, míg az ITS-szekvenciák változékonnyak, egy genuson belül is nagy variabilitást mutatnak. A konzervatív bázissorrendű szakaszok alkalmas helyet biztosítanak a primerek kapcsolódásához, a közrefogott szakaszok amplifikálása során nyert DNS-részek viszont variábilisek lesznek. Az ezek hasítása során nyert fragmentumok elektroforézis során a fajra jellemző mintázatot adnak.



1. ábra

Sarjadzó gombák riboszómális RNS génjeinek elhelyezkedése

Sarjadzó gombák okozta fertőzések terápiája

A rendelkezésre álló antifungális szerek száma sokkal kevesebb az antibakteriális szerekhez viszonyítva. Invazív fertőzések kezelésére csak a következő négy gyógyszer csoport áll rendelkezésre: poliének, azolok, nukleinsav szintézist-gátló antimikotikumok és az echinocandinok.

A polién típusú antifungális szerek közül a fungicid hatású amphotericin B (AMB) ellen a primer rezisztencia ritka (*Candida lusitanae*, *Candida guilliermondii* törzsek egy része, és a *Trichosporon beigelii*). Másodlagos rezisztenciát a *C. tropicalis*, a *C. glabrata* és a *C. krusei* fajok esetén jeleztek, ami a sejtmembrán megváltozott ergosterol tartalma miatt jön létre. A gyógyszer használhatóságát a régebben kissé alábecsült súlyosabb mellékhatások (vese, hidegrázás, stb.) korlátozhatják.

Az azol típusú antimikotikumok fungisztatikus hatású gombaellenes készítmények, amelyek a sejtmembrán ergosterol szintézisét gátolják. Az 1990-es évektől kezdve folyamatosan kerülnek bevezetésre az új, triazol típusú antimikotikumok, egyre szélesedő hatásspektrummal (flukonazol, itraconazol, posakonazol, vorikonazol és ravukonazol).

Az azol típusú szerek közül a legelterjedtebben használt készítmény a FLU, melynek hatásspektruma kiterjed a *Candida* és a *Cryptococcus* genusokra is, de a penészgombákra nem. Neutropéniás betegek gombás megbetegedéseinek a profilaxisára akár hosszú időn keresztül is jól alkalmazható. Bizonyított primer rezisztenciával a *C. krusei* törzsek és a *C. glabrata* törzsek egy része rendelkezik FLU iránt. Az utóbbi 7-8 évben limitált számú *in vitro* és *in vivo* adat alapján a *C. inconspicua* és a *C. norvegensis* esetén szintén felvetődött a primer rezisztencia lehetősége. FLU iránt szekunder rezisztencia hosszan tartó kezelések során szokott kifejlődni, főleg a *C. albicans*, *C. dubliniensis* és a *C. glabrata* fajok esetén.

A nukleinsav szintézist-gátló antimikotikumoknak egyetlen tagja az 5 fluorocitozin (5-FC). Hatását a timidilát szintetáz gátlásán keresztül fejti ki. Monoterápia esetén könnyen szekunder rezisztencia alakulhat ki, ezért főleg AMB-vel kombinálva alkalmazzák.

A sejtfal szintézist gátló antifungális szerek közül a caspofungin és micafungin jelenleg már elérhető a klinikumban invazív és egyéb terápiára nem reagáló candidiázisok kezelésére. Keresztrezisztencia nem áll fenn a többi antifungális szerrel szemben. Klinikai izolátumok esetén rezisztenciát eddig csupán hosszan tartó kezelés után észleltek. Relatív

magas MIC értéket a *C. parapsilosis*, a *C. guilliermondii* és a *C. lusitaniae* izolátumok esetén figyeltek meg. Jóváhagyott módszer a caspofungin iránti érzékenység vizsgálatára jelenleg nem áll rendelkezésre.

Sarjadzó gombák érzékenységének meghatározása

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

A sarjadzó gombák érzékenységének *in vitro* diagnosztikájában jelenleg az 1997-ben elfogadott referencia módszer (NCCLS M-27A) a legpontosabb és a legjobban reprodukálható. A módszer meghatározott tápfolyadék (RPMI-1640) és kezdő csíraszám (10^3 CFU/ml) alkalmazását írja elő, de munkaigényessége miatt a rutin laboratóriumi munkában ritkán alkalmazzák. Az inkubálási idő fajtól függően 48 illetve 72 órán keresztül tart.

A dokumentumban csak a FLU, az itraconazol és az 5-FC esetén találunk ajánlást a MIC értéken alapuló érzékenységi kategóriákra. A klinikai gyakorlatba nemrég bevezetett CAS esetén jelenleg nem eldöntött, hogy a MIC meghatározás során végpontként a teljes vagy a részleges gátlást kell alkalmazni, illetve az sem, hogy mennyi az optimális inkubációs idő (24 vagy 48 óra).

A kereskedelmi forgalomban több, a standard módszert helyettesítő, könnyen kezelhető érzékenység meghatározására alkalmas panel terjedt el, de a legújabb vizsgálatok szerint csupán néhány mutat jó korrelációt a standard módszerrel. A kereskedelmi forgalomban kapható módszerek közül az E-teszt a gyakorlatban is jól bevált alternatíva. Az E-teszt csíkok egy preformált koncentráció gradiens formájában

tartalmazzák a kérdéses antifungális szereket. E népszerű módszer egyes szerzők szerint nemcsak kitűnő alternatívája a standard, mikrodilúción alapuló módszernek, hanem AMB esetén annál jobb is, amikor AMB iránt rezisztens klinikai izolátumokat keresünk.

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

Minimális fungicid koncentráció meghatározása

Kritikus állapotú betegek esetén (endocarditis, neutropénia) szükség lehet az aktuális MIC értéken kívül a gyógyszer hatásosságát jobban jellemző fungicid hatás ismeretére. A fungicid hatás vizsgálata az idő-ölés (time-kill) görbék valamint a minimális fungicid koncentráció (MFC) meghatározása által lehetséges. Standardizált módszer (ellentétben a baktériumokkal) jelenleg nem áll rendelkezésre a sarjadzó és fonalas gombák MFC értékének a meghatározására. Újabban, a Cantón és munkatársai által leírt metodika a nagyobb kezdő inoculum által (10^4 sejt/ml) lehetőséget teremtett arra, hogy legalább 99,9 %-os ölést tudjunk mérni, ha a növekedést nem mutató mikroplate üregének a teljes tartalmát kioltjuk. Így vált ismertté, hogy a *C. parapsilosis* és a *C. dubliniensis* törzsek egy része toleráns az AMB iránt, azaz a MIC értéknél 32-szer nagyobb gyógyszer koncentráció sem pusztítja el a sarjadzó gombát. A módszert relatíve könnyű kivitelezhetősége miatt Cantón és munkatársai ajánlják a rutin laboratóriumi diagnosztikában is terápiára nem reagáló invazív candidiázisok esetén, az MFC meghatározására mivel a kapott eredmények jó korrelációt mutatnak az idő-ölés görbék által kapott eredményekkel. Az AMB-n kívül Cantón módszerével egyéb sarjadzó gombák MFC értékét eddig még nem vizsgálták.

Candida inconspicua és a Candida norvegensis fajok jellemzése

A DEOEC Orvosi Mikrobiológiai Intézetében 1997-től kezdve történik a sarjadzó gombáknak a pontos, faj szerinti azonosítása. A leggyakrabban izolált 5 fajon kívül (*C. albicans*, *C. glabrata*, *Candida tropicalis*, *C. krusei* és a *C. parapsilosis*) kis százalékban

egyéb, ritkán előforduló sarjadzó gombát is izoláltunk. A 2001-2002-es években a napi rutin munka során lettünk figyelmesek arra, hogy egyre gyakrabban izoláljuk a *Candida inconspicua* és a *Candida norvegensis* fajok valamelyikét a különböző vizsgálati agyagokból. Mivel az irodalmi adatok alapján e két faj a FLU iránt primer rezisztenciával rendelkezik figyelmünk a két faj felé terelődött.

A két faj elkülönítése hagyományos módszerekkel nehézséget okoz. Az ID32C panel esetén az eszkulin-hidrolízis, míg rizsagaron a pszeudohifaképzés vizsgálata alapján lehetséges a két faj elkülönítése. A *C. norvegensis* rizsagaron pseudohypha képzésére képes és az eszkulin-hidrolízise pozitív. Ezen vizsgálatok *C. inconspicua* esetén negatív eredményt adnak.

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

A *C. inconspicua* és a *C. norvegensis* FLU iránti érzékenysége az irodalmi adatok alapján vegyes képet mutat. Bár a két fajt FLU iránt rezisztensnek tartják, az alkalmazott vizsgálati módszertől függően az irodalomban számos FLU iránt érzékeny törzset is fel lehetett fedezni. Hasonlóan, az AMB és az 5-FC iránti érzékenysége a két fajnak, az alkalmazott módszertől függően változott a nemzetközi irodalom szerint.

Célkitűzések

1. Munkánk során választ kerestünk a rutin diagnosztikában *C. inconspicua*-nak és *C. norvegensis*-nek diagnosztizált törzsek pontos, species szerinti eloszlására. A hagyományos diagnosztikai módszerekkel kapott eredmények ellenőrzése céljából molekuláris biológiai módszert (riboszómális DNS vizsgálata) használtunk.
2. A *C. inconspicua* törzsek FLU iránti érzékenységet a standard mikrodilúciós módszer (NCCLS M27 A-2) szerint határoztuk meg, választ keresve arra, hogy valós-e a *C. inconspicua* irodalmi adatokból ismert rezisztenciája FLU iránt. Megvizsgáltuk, hogy emelt kezdő csíraszám és rövidebb, 24 órás inkubációs idő mennyire befolyásolja a kapott MIC értékeket a standard módszerhez képest.
3. Terápiás alternatívát keresve meghatároztuk a törzsek érzékenységét a standard módszer szerint AMB, 5-FC és CAS iránt. Az izolátumok érzékenységét AMB és CAS esetén E-teszt segítségével is meghatároztuk.
4. A továbbiakban a törzsek érzékenységét FLU, AMB és 5-FC iránt a break-point elven működő Fungiteszt segítségével határoztuk meg. A kapott érzékenységi kategóriákat a standard módszerrel kapott érzékenységi kategóriákhoz hasonlítottuk.
5. Az AMB, az 5FC és a CAS klinikai hatásosságának jobb megítélése miatt, emelt kezdő csíraszám alkalmazásával elvégeztük a minimális fungicid koncentráció meghatározását.
6. A CAS esetén a kapott MIC és MFC értékek alapján tovább standardizáltuk a helyes MIC meghatározást, az inkubálási idő és a különböző MIC végpont értékek figyelembevételével.

Anyagok és módszerek

Sarjadzó gombák izolálása betegekből

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

Sarjadzó gombák azonosítása hagyományos módszerekkel

A Sabouraud-agaron nőtt tenyészeteket először főtális borjúsérumban inkubáltuk 2 órán keresztül, csíratömlő képzés detektálása céljából. Ezzel párhuzamosan elvégeztük a CHROMagar Candida táptalajra történő leoltást is. A további azonosítás az ID 32C panel segítségével történt. Az izolátumok hifa és pszeudohifa képzését rizsagaron vizsgáltuk.

Sarjadzó gombák azonosítása molekuláris biológiai módszer segítségével

A DNS-izolálását Hoffman és Winston módszerével végeztük. A rDNS-nek kb. 1900 bp-nyi szakaszának amplifikációja az NS3 és az ITS4 jelzésű primer segítségével történt. Az amplifikált szakasz magában foglalja a rDNS 18S alegységének egy szakaszát, az 5,8S alegységet, a két ITS szakaszt és a nagy rDNS egy kis darabját. Az amplifikált termékeket MspI, RsaI, ScrFI és HaeIII restriktációs enzimekkel hasítottuk. A kapott fragmentumokat etídium-bromidot tartalmazó gélben hagyományos gélelektroforézissel szeparáltuk. A ribotipizálással kapott gélmintázatok kiértékelése számítógépes program segítségével (Molecular Analyst Program, BioRad) történt. Referencia törzsként a *C. krusei* ATCC 6258, a *C. inconspicua* 16783 ATCC és a *C. norvegensis* ATCC 22977 számú törzset használtuk.

Érzékenység meghatározása mikrodilúciós módszer szerint

Referencia érzékenységi módszerként a standard mikrodilúciós módszert (NCCLS M27-A2) használtuk. A FLU (Pfizer), az 5-FC (Sigma) és a CAS (Merck Research Laboratories) szubsztanciákat steril desztillált vízben, míg az AMB-t (Sigma) 100 % dimetil szulfoxidban oldottuk fel. Az antifungális szerek koncentrációi a következők voltak: FLU: 0,25-128 µg/ml, 5-FC: 0,12-64 µg/ml, AMB és CAS: 0,015-8 µg/ml.

A sarjadzó gombák 20-24 órás, Sabouraud-agaron nőtt friss tenyészetéből 0,5 McFarland Standard sűrűségű szuszpenziót készítettünk. A kívánt csíraszám (10^3 vagy 10^4 sejt/ml) beállításához a hígításokat RPMI 1640-ben oldattal végeztük. A sarjadzó gombák 100µl-es szuszpenzióját ezután hozzámértük a megfelelő antifungális szert kétszeres koncentrációban tartalmazó mikroplate-be. Az inkubálást 35 °C-n történt. Az érzékenységi eredmények vizuális leolvasását 24 és 48 óra után egyaránt elvégeztük.

AMB B, 5-FC és FLU esetén referencia eredménynek a 48 órás inkubálási idő után kapott MIC értékeket vettük. Caspofungin esetén a referencia MIC a 24 óra utáni, részleges gátlás MIC eredménye volt.

Érzékenység meghatározása E-teszt és Fungitest segítségével

Az érzékenység meghatározása mindkét esetben a gyártó ajánlása alapján történt. Az inkubálást 35 °C-on végeztük. E-teszt esetén a MIC értékeket 24 és 48 óra múlva egyaránt meghatároztuk. Fungitest esetén az inkubálás 48 óráig tartott.

Minimális fungicid koncentráció meghatározása

Az MFC meghatározását AMB és 5-FC esetén a Cantón és munkatársai által leírtak szerint végeztük. A plate-ek elkészítése az NCCLS M27-A2 ajánlása alapján történt. Az inokulum mennyisége AMB és 5FC esetén hozzávetőleg 10^4 CFU/ml volt, amit kvantitatív kioltással ellenőriztünk. Az inkubálás 48 óráig, 35 °C-n történt.

A 48 órás MIC meghatározás után a mikroplate teljesen tiszta üregeinek a tartalmát pipettával összeszuszpendáltuk és a teljes mennyiséget 2 db Sabouraud-agarra kioltottuk (100-100µl). A szuszpenziót hagytuk megszáradni, majd steril kaccsal a Sabouraud-agar felületére kihúztuk a kioltott sarjadzó gomba sejteket. Ezzel a módszerrel eltávolítottuk a

sejteket a szuszpenzióban lévő gyógyszertől, így az antifungális szer nem gátolta a sarjadzó gombák növekedését, megakadályozva ezzel, hogy tévesen alacsony MFC kapjunk. A Sabouraud-agar plate-k inkubálása 48 órán át, 35 C⁰-n történt.

Caspofungin esetén Cantón és munkatársai módszerét módosítva, 10⁵ CFU/ml kezdő csíraszámát használtunk. További módosítás volt, hogy a mikroplate üregeinek a teljes tartalmát kioltottuk a részleges gátlást mutató első üregtől kezdve. A kioltást 24 és 48 órás inkubációs idő után is elvégeztük.

Érzékenységi eredmények interpretálása

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

FLU és 5-FC esetén az NCCLS M 27-A2 ajánlásának megfelelő határértékeket alkalmaztuk, az érzékenységi kategóriák megállapításánál. AMB esetén a jelenleg legjobban elfogadott, <1 µg/ml MIC értékhatárt alkalmaztuk a rezisztencia határértékének. Caspofungin esetén a Stone által javasolt ≤1 µg/ml-s érzékenységi határt használtuk.

A különböző módszerekkel kapott MIC értékeket AMB, FLU és CAS esetén a standard módszerrel kapott referencia MIC értékekhez hasonlítottuk. Az átlagos egyezés számítása: a kapott MIC érték ± 1 hígítási fokban azonos eredményt adott a standard módszerrel kapott MIC értékkel. Hasonlóan, az érzékenységi kategóriák egyezését úgy számoltuk, hogy az adott módszerrel kapott érzékenységi kategóriát hasonlítottuk a standard módszerrel kapott érzékenységi kategória eredményéhez.

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

Eredmények

Sarjadzó gombák azonosítása hagyományos módszerek alapján

Csíratömlőt egyetlen tesztörzs és klinikai izolátum sem képezett. Az ID 32C panel segítségével elvégzett vizsgálatok alapján 27 izolátumot az identifikáló rendszer *C. inconspicua*/ *C. norvegensis*, míg 2 másik izolátumot *C. inconspicua*/ *C. norvegensis*/ *C. krusei* fajoknak azonosította. A három faj pontos elkülönítésére az eszkulin hidrolízist javasolja a gyártó (BioMérieux). A 29 izolátumból 28 db hidrolizálta az eszkulint, ezért ezt a 28 törzset *C. norvegensis*-nek azonosítottuk. A tesztörzsek közül egyedül a *C. norvegensis* ATCC 22977 számú törzse hidrolizálta az eszkulint.

Rizsagaron a 29 klinikai izolátum közül csak 1 esetben észleltük, hogy a törzs pszeudohifát képez. Ugyanez a törzs hidrolizálta az eszkulint is. A tesztörzsek közül csupán a *C. krusei* ATCC 6258-s számú törzse képezett pszeudohifát. A pszeudohifa képzés alapján 28 törzsünket *C. inconspicua*-nak azonosítottuk

Sarjadzó gombák azonosítása molekuláris biológiai módszer segítségével

A négyféle restrikciós enzimmal történő hasítás majd a kapott fragmentumok elektroforézise után a 3 ATCC tesztörzs esetén három, jól elkülöníthető mintázatot kaptunk. A klinikai izolátumok mindegyike a *C. inconspicua* ATCC 16783-s törzsére jellemző mintázattal egyezett meg. Eredményünk alapján tehát az eszkulint hidrolizáló, de pszeudohifát nem képező összes izolátumunk *C. inconspicua*-nak bizonyult.

Flukonazol iránti érzékenység meghatározása

A standard módszer alapján kapott eredményeink azt mutatják, hogy a törzsek túlnyomó többsége dózis-függő érzékenységet (DÉ) ($MIC_{90}=32 \mu g/ml$) mutat a FLU iránt, érzékeny (É) törzset nem találtunk. A normál és az emelt csíraszámú inokulummal 24 órás inkubálás után 3 illetve 1 esetben É izolátumot is detektáltunk. A standard módszerrel rezisztensnek (R) bizonyult 5 izolátum közül, a normál és az emelt inokulummal végzett 24 órás leolvasás esetén 3 illetve 2 törzs a DÉ kategóriába került. Az átlagos egyezés a módosított mikrodilúciós módszerek és a standard metodika között ± 1 hígítási fokban kiváló volt (93,7-100 %). Azonos érzékenységi kategóriát 66,7-89,5 %-ban

diagnosztizáltunk. Az érzékenységi kategória változás döntő részben a DÉ törzseknek a R kategóriába kerülése miatt következett be.

E-teszt alkalmazásával törzsek alig fele tartozott a DÉ kategóriába, nagymértékben növekedett azonban a R izolátumok száma. A 24 órás eredmények esetén 3 esetben tapasztaltunk fals pozitív érzékenységet. A MIC értékek különösen a 48 órás inkubálás után emelkedtek meg ($MIC_{50/90}=64/128 \mu\text{g/ml}$). Leolvasási időtől függetlenül, a standard módszerrel R-nek bizonyult törzseket az E-teszt pontosan detektálta.

A Fungitest-el kapott eredmények öt É és egy R izolátum mellett a törzsek túlnyomó részét DÉ-nek mutatták (87,4 %). Az érzékenységi kategóriaegyezés nagyon jó volt a standard módszerrel összevetve (81,1%) de 5 DÉ törzset É-nek illetve az 5 R törzs közül 4-t DÉ-nek mutatta a módszer.

Amphotericin B in vitro aktivitása C. inconspicua izolátumok ellen

A standard módszerrel nyert 48 órás MIC értékek alapján a törzsek többsége (27/48, 56,3 %) rezisztensnek bizonyult AMB iránt. A törzsek érzékenységét E-teszttel vizsgálva a kapott eredmények átlagosan 2 (24 órás inkubáció után) illetve 1 (48 órás inkubáció után) hígítási fokkal voltak alacsonyabbak a standard módszerrel kapott MIC eredményeknél ($MIC_{90}=0,5 \mu\text{g/ml}$, mindkét esetben). Az E-teszttel kapott érzékenységi kategória egyezés rossz volt a standard módszerrel összehasonlítva 24 óra (41,7 %) és 48 óra (45,8 %) inkubációs idő után is. Fungitest-et használva minden törzs É-nek bizonyult AMB iránt, azaz a standard módszerrel R-nek bizonyult összes törzsünket É-nek mutatta a Fungitest.

5-fluorocitozin iránti érzékenység meghatározása

A standard módszer szerint minden izolátum érzékenynek bizonyult ($MIC_{90}=2\mu\text{g/ml}$). A *C. inconspicua* izolátumok érzékenységét Fungitest-el vizsgálva a 48 izolátumból csak 7 bizonyult É-nek, a többi a MÉ kategóriába tartozott. A standard módszerrel való egyezés csupán 14,4 %-s volt.

Caspofungin iránti érzékenység meghatározása

A caspofungin kiváló *in vitro* aktivitást mutatott a *C. inconspicua* törzsek iránt, különösen, ha a részleges gátlást választottuk a MIC érték végpontjának (MIC₉₀ 24 és 48 óra után 0,25 µg/ml). Ha a teljes gátlást választottuk végpontnak, a MIC értékek átlagosan 2 hígítási fokkal emelkedtek, 24 illetve 48 óra után a MIC₉₀ érték egyaránt 1 µg/ml volt. Az E-teszttel kapott MIC eredményeket (24 és 48 óra után) összehasonlítva a standard módszerrel nyert MIC értékekkel ($\pm$ egy hígítási fokon belül) jó egyezést csak a 24 órás, részleges gátlási végponttal nyert leolvasással kaptunk (87,5 %).

Minimális fungicid koncentráció meghatározása

AMB esetén a törzsek többségének az MFC értéke 2x illetve 4x volt nagyobb az aktuális MIC értéknél. Eredményünk alapján az AMB iránti tolerancia (MFC $\geq$ 32 x MIC) nem jellemző a *C. inconspicua* törzsekre.

5-FC esetén az MFC értékek széles határok között mozogtak (MFC=1-32 x MIC) és a törzsek 50 %-a toleránsnak bizonyult az 5-FC iránt.

CAS esetén kapott MFC értékek 24 órás inkubációs idő után 0,12-1 míg 48 órás inkubációs idő után 0,12-0,25 µg/ml határok között helyezkedtek el. Az MFC értékek soha nem haladták meg a MIC értékek négyszeresét. Az MFC értékek a 24 és a 48 órás inkubációs idő utáni kioltások után csak 2 esetben érték el a 48 órás, teljes gátlási végpontként kapott MIC értéket.

Megbeszélés

Sarjadzó gombák azonosítása hagyományos és molekuláris biológiai módszerekkel

A kísérletünk első szakaszában kapott eredmények megerősítik, hogy a biokémiai reakciók és a morfológiai vizsgálatok nem mindig elegendőek a pontos fajsztíű azonosításhoz a *C. inconspicua* és a *C. norvegensis* esetén. A hagyományos módszerek eredményei közötti ellentmondás feloldása csupán molekuláris biológiai módszer alkalmazásával volt lehetséges. Eredményünk alapján úgy tűnik, hogy az eszkulin hidrolízis nem megfelelő módszer a két faj elkülönítésére. Nho és munkatársai korábbi munkájukban a mienkhez hasonló problémával találkoztak a BioMérieux cég által a rendelkezésükre bocsátott *C. inconspicua* és *C. norvegensis* törzsek esetén. Módszerükkel (egyetlen restrikciós enzim) csupán a kapott restrikciós fragmentumoknak a szekvenálása által lehetett a két faj pontosan elkülöníteni, mivel a kapott fragmentumoknak a mérete a két faj esetén nagyon közel állt egymáshoz. Munkájuk során referencia törzsként nem ATCC tesztörzset használtak a *C. inconspicua* esetén. Saját módszerünkkel, bár négyféle restrikciós enzimet használtunk az amplifikált rDNS hasítására, a kapott mintázat alapján szekvenálás nélkül gyorsan és pontosan el tudtuk különíteni egymástól a két fajt.

Flukonazol iránti érzékenység meghatározása

A mikrodilúciós módszer alapján kapott eredményeink alapján a *C. inconspicua* FLU iránti *in vitro* csökkent érzékenysége saját vizsgálatunk alapján megerősítést nyert, így a FLU-nak nincs helye a *C. inconspicua* okozta fertőzések kezelésében. Eredményeink alapján 24 órás (normál és emelt inokulum) inkubációs idő után fennáll a lehetősége a R törzsnek DÉ törzsként történő félre diagnosztizálásának, így a módosított mikrodilúciós módszerek nem helyettesíthetik a standard módszert *C. inconspicua* esetén.

A klinikai izolátumok FLU iránti érzékenységét E-teszt-el vizsgálva nagyszámú, fals rezisztens törzset detektáltunk. Leolvasási időtől függetlenül, a standard módszerrel rezisztensnek bizonyult törzseket azonban pontosan detektálta a módszer. Ennek terápiás jelentősége van, hiszen a betegek kezelése során elkerülhetjük a biztosan hatástalan szerrel való terápiát, még mielőtt a pontos fajmeghatározás rendelkezésünkre állna. Az E-teszt tehát jó választásnak tűnik a FLU rezisztens klinikai izolátumok keresésére (screening), de nem a pontos MIC meghatározásra.

A Fungiteszt-el kapott eredmények azt mutatják, hogy a rezisztens klinikai izolátumokat kis hatékonysággal képes detektálni, bár az érzékenységi-kategória egyezés a standard módszerrel összehasonlítva jó volt. A Fungiteszt-tel kapott eredmények kritika nélküli elfogadásának súlyos terápiás következménye lehet, mivel R izolátummal történő fertőzés esetén a törzs a DÉ kategóriába kerülhet, amikor még az emelt dózissal (800-1000 mg/nap) történő kezelés is biztosan hatástalan.

Amphotericin B in vitro aktivitása C. inconspicua izolátumok ellen

A standard módszerrel nyert 48 órás MIC értékek alapján a törzsek nagy része a R kategóriába tartozott, így a MIC értékek alapján az AMB nem tűnik jó választásnak a *C. inconspicua* törzsek ellen. Meglepő módon és az irodalmi adatokkal ellentétben az E-teszttel kapott kategória-egyezés rossz volt a standard módszerrel összehasonlítva mind 24 óra (41,7 %) mind, pedig 48 óra (45,8 %) inkubációs idő után. Adataink azt jelzik, hogy az AMB-re csökkent érzékenységet mutató törzsek keresésére (screening) ajánlott E-teszt metodika használhatósága, legalábbis *C. inconspicua* esetén korlátozott.

A Fungiteszt nagyszámú fals érzékeny izolátumot detektált, ami az inadekvát határérték (az elfogadott 0,5 µg/ml helyett 2 ill. 8 µg/ml) következménye. A magasabb határérték miatt a Fungiteszt nem képes biztonságosan detektálni a R törzseket, így alkalmazása a rutin diagnosztikában nem biztonságos a beteg szempontjából AMB esetén.

5-fluorocitozin iránti érzékenység meghatározása

Mivel minden izolátumunk érzékenynek bizonyult (MIC₉₀=2µg/ml) az 5-FC iránt ez azt jelenti, hogy a *C. inconspicua* törzsek nem rendelkeznek primer rezisztenciával az 5-FC iránt. A *C. inconspicua* izolátumok érzékenységét Fungiteszt-el vizsgálva szembetűnő a nagyszámú fals érzékenységi eredmény. Ez szintén a helytelenül megválasztott MIC határérték (2µg/ml a 4µg/ml helyett) miatt következett be, bár a kapott eredmények a betegek kezelését károsan befolyásoló hatása nincs.

Caspofungin iránti érzékenység meghatározása

A caspofungin kitűnő *in vitro* aktivitást mutatott a *C. inconspicua* törzsek ellen, függetlenül a leolvasási módszertől. Eredményünk egyezik az irodalmi adatokkal, amely

alapján, ha a totális gátlást választjuk a MIC végpontjának, akkor 1-2 hígítási fokkal magasabb lesz a kapott MIC érték a részleges gátlással kapott MIC értékhez képest.

Sarjadzó gombák CAS iránti MIC értékeinek összehasonlító vizsgálatát a standard módszer és E-teszt egyidejű alkalmazásával eddig két esetben végezték el. Jó egyezést a két módszer között csupán a kevésbé szigorú, $\pm$ két hígítási léptékű egyezés esetén kaptak a szerzők. Mindkét esetben a MIC értékeket 48 órás, teljes gátlást mutató végpont alkalmazásával nyerték. Eredményeink alapján a 24 óra után leolvasott CAS E-teszt eredmények a 24 órás, részleges gátlási értékek alapján kapott MIC értékekkel, a sokkal szigorúbb, $\pm$ egy hígítási fokon belül is kitűnő korrelációt mutatnak.

Minimális fungicid koncentráció meghatározása

Vizsgálataink alapján az AMB iránti tolerancia ($MFC \geq 32 \times MIC$) nem jellemző a *C. inconspicua* törzsekre. Figyelemre méltó, hogy a vérben elérhető $2\mu\text{g/ml}$ csúcskoncentráció értéket soha nem haladták meg a MFC értékek. Ez azt jelenti, hogy a napi 1mg/kg dózissal történő AMB kezelés során a szérumban elérhetjük a kórokozó eradikálásához szükséges koncentráció értéket, azaz az AMB alkalmas a *C. inconspicua* okozta invazív fertőzések kezelésére az *in vitro* eredmények alapján. Ezzel szemben Nguyen és munkatársai azt találták, hogy nagyobb valószínűséggel várható terápiás sikertelenség, ha a 48 órás inkubáció után kapott MFC értékek meghaladják az $1\mu\text{g/ml}$ -es értéket. Eredményeink illetve a Nguyen és munkatársai által kapott eredmények alapján további vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy az AMB alkalmas-e a *C. inconspicua* által okozott fertőzések kezelésére.

5-FC esetén a törzsek 50 %-a toleránsnak bizonyult az 5-FC iránt, jelezve, hogy az 5-FC inkább fungisztatikus mint fungicid hatású antifungális szer *C. inconspicua* ellen. A *C. inconspicua* törzseknek az 5-FC iránti toleranciájának a klinikai jelentősége nem ismert. *In vitro* adataink alapján a MFC értékek nem érik el a vérben még biztonságosan elérhető $100\mu\text{g/ml}$ -es értéket, ezért az 5-FC-nak szerepe lehet a *C. inconspicua* fertőzések kezelésében. Mivel monoterápia esetén az addig érzékeny izolátum könnyen rezisztenssé válhat a kezelés folyamán, ezért az 5-FC csupán kombinációs terápia részeként ajánlható *C. inconspicua* fertőzések kezelésére.

A CAS-al kapott MFC értékek közelsége a 24 órás, részleges gátlási végponttal kapott MIC értékekhez azt sugallják, hogy a teljes és a részleges gátlási végpontokkal

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

Összefoglalás

Munkánk során a rutin diagnosztikai módszerekkel könnyen összetéveszthető *C. inconspicua* és *C. norvegensis* fajok elkülönítő vizsgálatát végeztük hagyományos és molekuláris biológiai módszerek segítségével. A rDNS PCR-el történő amplifikálása, majd a kapott termékeknek négyféle restrikciós enzimmel történő hasítása által egyértelműen sikerült a két fajt egymástól elkülöníteni.

Negyvennyolc klinikai izolátum érzékenységét határoztuk meg FLU, AMB, 5-FC és CAS iránt a standard mikrodilúciós módszer segítségével. Bebizonyítottuk, hogy a *C. inconspicua* törzsek valóban csökkent érzékenységet mutatnak a FLU iránt és magas a rezisztens törzsek száma AMB iránt. A MIC értékek alapján a törzsek kitűnő érzékenységet mutatnak az 5-FC és a CAS iránt.

Az alternatív érzékenység meghatározási módszerek közül csupán a CAS E-teszt alkalmas a pontos MIC meghatározásra. A FLU E-teszt segítségével a rezisztens klinikai izolátumot még a pontos fajmeghatározás eredménye előtt fel lehet ismerni, időben megelőzve a terápiás sikertelenséget.

A Fungiteszt a nem megfelelő határ-érték koncentrációk miatt nem javasolható sem a FLU, sem az AMB, sem pedig az 5-FC esetén az érzékenység meghatározására.

Az MFC értékek alapján az AMB és az 5-FC esetén további vizsgálatok szükségesek az esetleges terápiás alkalmazás alátámasztására.

Az CAS az MFC értékek alapján is kitűnő aktivitást mutatott a *C. inconspicua* törzsek ellen. Az MFC eredmények felhasználásával bebizonyítottuk, hogy MIC meghatározás során, a totális gátlási végpont alkalmazásával kapott tévesen magas MIC értékek elpusztult gombasejtek következményeként tapasztalhatók. Ennek megfelelően *C. inconspicua* esetén a valós CAS MIC értéket a kontrollhoz képest az első jelentős turbiditás csökkenéshez képest kell számítani nem, pedig a teljes gátláshoz képest.

KÖZLEMÉNYEK

AZ ÉRTEKEZÉST MEGALAPOZÓ KÖZLEMÉNYEK:

1. **Majoros, L.**, G. Kardos, Á. Belák, A. Maráz, L. Asztalos, E. Csánky, Z. Barta, and B. Szabó. 2003. Restriction enzyme analysis of ribosomal DNA shows that *Candida inconspicua* clinical isolates can be misidentified as *Candida norvegensis* with traditional diagnostic procedures. J. Clin. Microbiol. **41**:5250-5253. **IF:3,565**
2. **Majoros, L.**, G. Kardos, B. Szabó., M. Kovács, and A. Maráz. 2005. Fluconazole susceptibility testing of *Candida inconspicua* clinical isolates: comparison four method. J. Antimicrob. Chemother. **55**:275-276. **IF: 3,08**
3. **Majoros, L.**, G. Kardos, P. Feiszt, B. Szabó. 2005. Efficacy of amphotericin B and 5-fluorocytosine against fluconazole resistant *Candida inconspicua* clinical isolates J. Antimicrob. Chemother. Közlésre elfogadva. **IF: 3,08**
4. **Majoros, L.**, G. Kardos, B. Szabó., and M. Sipiczki. 2005. Caspofungin susceptibility testing of *Candida inconspicua*: correlation of different methods with the minimal fungicid concentration. Antimicrob. Agents Chemother. Közlésre elfogadva. **IF: 4,254**

TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK:

1. Barta, Z., I. Csípő, G. Mekkel, M. Zeher, **L. Majoros**. 2004. Seroprevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn Disease. J. Clin. Microbiol. **42**:5432. **IF:3,489**
2. Sugita, T., K. Takeo, M. Ohkusu, E. Virtudazo, M. Takashima, E. Asako, F. Ohshima, S. Harada, C. Yanaka, A. Nishikawa, **L. Majoros**, M. Sipiczki, 2004. Fluconazole-resistant pathogens *Candida inconspicua* and *Candida norvegensis* DNA sequence diversity of the rRNA intergenic spacer region, antifungal drug susceptibility, and extracellular enzyme production.. Microbiol. Immunol. **48**:761-766. **IF: 1,111**

3. Szabó, B, C. Miszti, **L. Majoros**, Z. Nábrádi, and Sz. Gomba. 2000. Isolation of rare opportunistic pathogens in Hungary. Case report and short review of the literature. *Acta Microbiol. Hung.* **47**:9-14.
4. Pócsi, I., L. Sámi, É. Leiter, **L. Majoros**, B. Szabó, T. Emri, and T. Pusztahelyi. 2001. Searching for new type antifungal drugs. *Acta Microbiol. Hung.* **48**:533-543.
5. **Majoros, L.**, G. Kardos, I. Pócsi, and B. Szabó. 2002. Distribution and susceptibility of *Candida* species isolated in the Medical University of Debrecen. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **49**:351-361.

IDÉZHETŐ ELŐADÁSKIVONATOK:

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

6. Szabó, B., C. Miszti, **L. Majoros**, M. Farkas, and L. Fodor.(1998). Comparison of pathogenecity of human and equine *Rhodococcus equi* strains. FASEB J, 12 A. 574.