

XXXII. OTDK Biológia Szekció

A gombák okozta véráram- fertőzések előfordulása a Szegedi Tudományegyetem klinikáin

Venkei Annamária

Biológus Msc II. évfolyam

**Szegedi Tudományegyetem, Szent- Györgyi Albert Klinikai
Központ**

Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet

Témavezető: Csányiné Dr. Dóczi Ilona, egyetemi adjunktus

Belső konzulens: Dr. Pfeiffer Ilona, egyetemi docens

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	3
Bevezetés	4
1. A gombák okozta véráram-infekciók kialakulása	4
2. Hajlamosító tényezők, veszélyeztetett betegcsoportok	5
3. Tünetek	5
4. Lehetséges patogének	6
5. Diagnosztikai lehetőségek	7
6. Terápia	9
Célkitűzések	10
Anyagok, módszerek	11
1. Az izolátumok eredete	11
2. Tenyésztésen alapuló metodikák	11
3. MALDI-TOF készülékkel történő azonosítás	12
4. Galaktomannán antigénkimutatás	14
5. Molekuláris biológiai vizsgálatok (PFGE)	14
5.1. A PFGE-hez szükséges törzsoldatok összetétele	14
5.2. Intakt kromoszómális DNS preparációja	14
5.3. PFGE	15
Eredmények	16
1. Epidemiológiai vizsgálatok eredményei	16
2. A molekuláris biológiai vizsgálatok eredményei	21
3. A morfológiai identifikálási módszerek és a MALDI- TOF eredményeinek összefoglalása	23
Megbeszélés	24
1. Epidemiológiai adatok értékelése, összehasonlítása a nemzetközi irodalmi adatokkal	24
2. A molekuláris biológiai vizsgálatok értékelése	26
3. MALDI-TOF és a morfológiai metodikák összehasonlítása	28
Összefoglalás	29
Irodalomjegyzék	30
Köszönetnyilvánítás	33
Tételes szerzői hozzájárulás	34

Rövidítések jegyzéke

AIDS: szerzett immunhiányos tünetegyüttes
CT: computer tomográf
MIC: minimális gátló koncentráció
CLSI: Klinikai és Laboratóriumi Szabványok Intézete
EUCAST: Európai guideline az antibiotikum rezisztencia értékelésére
PCR: polimeráz láncreakció
LCR: ligáz láncreakció
SSCR: egy szálú konformációs polimorfizmus
PNA- FISH: peptid nukleinsav fluoreszcens in situ hibridizáció
DNS: dezoxiribonukleinsav
PFGE: pulzáltatott mezejű gélelektroforézis
RFLP: restrikciós fragmenthossz polimorfizmus
RAPD: random amplifikált polimorf DNS
MALDI-TOF: mátrix segített lézer deszorpció és ionizáció- tömegspektrométer
ELISA: enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálat
RIA: radio immunvizsgálat
PBSA: polibutilén-szukcinát-adipát
TRIS: tetramethylhydroxypiperidinol
HCl: hidrogén- klorid
EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav
YEPD: élesztő kivonat-pepton- dextróz
KCl: kálium- klorid
CHEF: rögzített homogén elektromos mező
ITO: Intenzív Terápiás Osztály

I. Bevezetés

1. A gombák okozta véráram-infekciók kialakulása

A véráram normális esetben steril és számos antimikróbás hatású komponenst tartalmaz. A mikróbák extravascularis (valamely fertőződött testtáj, a kolonizált bőr és nyálkahártyák sérülése), vagy intravascularis (natív vagy műbillentyű, kanül) módon kerülhetnek a vérbe. A fungaemia a gombák jelenlétét jelenti a vérben, mely lehet rövid ideig tartó, átmeneti pl. kisebb sebészi beavatkozásokat, húgyúti katéterezést követően. Extravascularis fertőzés jelenléte során a fungaemia szakaszos: a mikroorganizmusok időnként megjelennek, majd eltűnnek a vérben, míg intravascularis infektív forrás esetén a mikroorganizmusok folyamatos jelleggel jelen vannak az érpályában [1]. A gombák okozta véráram-fertőzések száma világszerte növekvő tendenciát mutat. Ezt támasztja alá több kutatás, köztük egy Kolumbiában végzett, mely kimutatta, hogy a gombák okozta fertőzések 4,1 %-át alkotják a véráram-fertőzéseknek, s kiemelt szerepet játszik a *Candida albicans* mint a leggyakoribb izolált gombafaj. Hasonló eredményekre jutottak a világ számos részén, mint pl. Amerikában, Kanadában vagy Európában [2].

Az emberi gombás megbetegedéseket két alapvető csoportra lehet osztani. Így megkülönböztetünk lokális és szisztémás mycosisokat. A lokális fertőzések kiindulópontjai lehetnek szisztémás infekcióknak, melyek súlyosak, és halálos kimenetellel is járhatnak. Az elmúlt években a gombás fertőzések abszolút száma növekedett, illetve nőtt a mycosisok okozta halálozás is. A fertőzések kialakulásában szerepet játszanak a betegek részéről a hajlamosító tényezők valamint a gombák virulenciafaktorai, s mindezek mellett a gyakran kontrollálatlan antimikotikum- és antibiotikumhasználat is fokozza az agresszívebb gombatörzsek megjelenését.

A gombák virulenciafaktorait nagyfokú diverzitás jellemzi, és lehetnek toxikusak vagy atoxikusak. Virulenciafaktorként szerepelhet a tok-, biofilmképzés, fenotípusos-átkapcsolás, a gombák sejtfalában az α -(1-3)-glukán molekulák jelenléte, proteolitikus enzimek termelése. Fonális gombákhoz köthető virulenciafaktorok a sziderofórok, ribotoxinok, gliotoxinok vagy a konídiumok termelése. A fonális növekedésért felelős faktorról ma már tudjuk, hogy szerepet játszik a gomba gazdaszervezetben történő agresszívebb elterjedésében, illetve a morfológiai fázisváltozások is összefüggnek a virulenciával [3].

2. Hajlamosító tényezők, veszélyeztetett betegcsoportok

A gombás fertőzések iránti fogékonyság egy vagy akár több hajlamosító tényező meglétét feltételezi. A hajlamosító tényezők számának emelkedése egy adott betegnél nem lineárisan, hanem exponenciálisan növeli a disszeminált mycosis kialakulásának lehetőségét. A hajlamosító tényezők nagy része ismert és alapbetegségek, betegségcsoportok szerint változik [4].

A gombák a normál flóra tagjaiként megtalálhatók az egészséges emberek bélcsatornájában, hüvelyében és más, nyálkahártyával borított felületén. Az immunrendszer és az ép nyálkahártyák feladata, hogy megakadályozzák patogén szerepének kialakulását. Ezen védelem sérülése vagy hiánya esetén a gombák opportunistá válnak, és megbetegedést okozhatnak. Hajlamosító tényező lehet valamely alapbetegség (pl. leukémia, karcinóma, diabetes mellitus, AIDS stb.) megléte, vagy egyes gyógyszeres terápiák (pl. szteroidok, immunszuppresszánsok) hosszas alkalmazása. Krónikus alkoholisták és intravénás kábítószer-élvezők körében is nagy valószínűséggel lépnek fel mycosisok a „kontroll” populációhoz képest. Hosszan tartó antibiotikum kezelés kedvező életteret biztosít a gombák szaporodásához [5]. Jelentős veszélyforrás az égési sérülések gombás fertőzése, mert a nyílt felület, a nedvesség, a necrosis kedvez a gombák szaporodásának. Iatrogén mycosisok alakulhatnak ki nagy dózisú sugárkezelés vagy kortikoszteroidok adagolása esetében.

Említést érdemelnek még az eszközhasználattal összefüggő infekciók. Az intenzív osztályokon a súlyos állapotú betegek ellátásakor szükség van különböző invazív beavatkozásokra, eszközök alkalmazására (intravaszkuláris kanül, katéterek), melyek infekcióforrást jelentenek. A nosocomialis fertőzést okozó ágens, gyakran a normál flóra tagja, vagy a kórházi környezetből származik [6]. Nagy hasi műtétek, szív és keringési rendszer műtétei, a szervtranszplantációk is hajlamosító faktorok, s a fiziológiás tényezőket figyelembe véve meghatározó a fizikai, táplálkozási állapot, stressz, terhesség. A leginkább veszélyeztetett korcsoport a koraszülöttek és az idősek [7].

3. Tünetek

A gombás betegségek viszonylag lassan fejlődnek ki, hetekig, hónapokig, sőt évekig perzisztálhatnak [8]. Gyakran tünetmentesen kolonizálnak, mely a gazdaszervezet működését közvetlenül alig befolyásolja, míg disszeminált esetben drámai elváltozásokat okozhatnak az egyes szervek működésében, de sajnálatos módon ez esetben sem ismertek a kórképre specifikus tünetek. A betegek döntő többsége lázas, hidegrázás csak mintegy 25

%-nál fordul elő. A disszeminált gombainfekciók időben történő felismerése nem könnyű, a diagnózis felállítását nehezíti a specifikus tünetek hiánya. Fertőzés alapos gyanúja áll fenn, ha szisztémás gyulladásos reakció, ill. szepszis tünetei (láz, tachycardia, leukopenia, stb...) mellett minimum 3 napos antibiotikum kezelés hatástalan, és legalább 2 különböző testtájáról vett mintából gomba tenyésztett ki. Biztos jelként fogadható el, ha gombás endophthalmitisre utaló szemfenéki kép látható. Pozitív jelként fogható fel még többek között egyes gombákra jellemző CT-kép (pl. aspergilloma). A biztos diagnózis felállítása nehéz, a diagnózist megnehezíti, hogy a hemokultúra a szisztémás esetek 50 %-ban negatív lehet, diagnosztikai módszerek lassúak, a szerológiai diagnosztika nehéz és alacsony szenzitivitású. Egyes adatok szerint a disszeminált fertőzések letalitása 40 % feletti, mely adat felhívja a figyelmet a megelőzés, korai diagnózis és terápia jelentőségére [9].

4. Lehetséges patogének

Humán patogén gombák származhatnak a normál flóra tagjai közül és a környezetből is nagy számban. A gombák túlnyomó többsége a mesterséges építményekben, talajban, növényeken, vízben, levegőben fordul elő. A penészes lakások, épületek az allergiás folyamatok és akár invazív mikózisok kiváltói lehetnek. Opportunista mikózisok kiváltásában több genus közül kiemelhetők a *Candida* és a *Rhodotorula* nemzetségek. A *Cryptococcus*, *Aspergillus* nemzetségekbe tartozó fajok szintén izolálhatók invazív klinikai mintákból.

A gombák okozta fertőzések 75 %-ért a *Candida* fajok felelősek, 2. helyen az *Aspergillus*, míg a 3. helyen a *Cryptococcus* fajok állnak gyakoriságukat tekintve. A candidák közül is a *C. albicans* felelős a legtöbb infekcióért. A több mint 100 *Candida*-faj közül a *C. albicans* mellett a *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. inconspicua* fordulnak elő leggyakrabban, mint humán kórokozók. A fertőzés leginkább endogén eredetű, mert a kórokozó a szájüreg, a női nemi szervek nyálkahártyáján és a gasztrointesztinális traktusban fordul elő. Csecsemőkben és legyengült, beteg felnőttekben szájpenészt okoz, de emellett változatos formái is ismertek a betegségnek pl. nyálkahártya-, bőr-, generalizált candidiasis.

A *Rhodotorula* genus 6 fajt foglal magába, mely közül a *Rh. rubra* fordul elő a leggyakrabban. Szerepet játszhat meningitis, endocarditis vagy peritonitis kialakulásában [10].

A *Cryptococcus neoformans* szintén invazív vagy lokalizált gombás megbetegedések okozója lehet. A természetben a madár (galamb) ürülékkel fertőzött

talajban és gyümölcsökön található. Alsólégúti vagy központi idegrendszeri infekciókat eredményezhet főként immunkárosodással járó alapbetegségben szenvedőkben.

Az *Aspergillus* genus kiemelt tagjai az *A. flavus*, *A. fumigatus*, és az *A. niger*. Rothadó anyagokból és a levegőből jutnak be a gombaelemek (conidiumok, spórák) a szervezetbe, s a légutakból a véráram révén szóródhat a patogén [11-13].

5. Diagnosztikai lehetőségek

Az invazív mikózisok diagnosztikája nem egyszerű. A klinikai kép ilyen esetben nem kellően megbízható az aspecifikus tünetek miatt. A mikrobiológiai laboratóriumi diagnosztikai módszerek jórészt időigényesek, holott egy invazív mikózis esetén az idő fontos tényező a kimenetelt illetően. A fajok megbízható azonosítása fontos az antifungális szerekek szembeni természetes rezisztenciájuk miatt, valamint epidemiológiai szempontból is. Az identifikálás során a rutin laboratóriumi diagnosztikában elsősorban morfológiai és/vagy biokémiai vizsgálatokra támaszkodnak a mikrobiológusok.

A klinikai anyagok feldolgozása során, ha lehetséges, a legelső lépés a minta mikroszkópos vizsgálata, mely által akár néhány perc alatt közelebbi információhoz juttathatjuk a klinikust, azonban fontos megjegyezni, hogy egy negatív mikroszkópos lelet nem zárja ki a kórokozó jelenlétét. Az anyagot natív és festett készítményben vizsgálhatjuk. Gyakran alkalmazott festési eljárás a perjódsavas-Schiff (PAS) festés. Ez a módszer ugyan gyors és informatív, de más módszerek általi megerősítést igényel. A bakteriológiai metodikák közül a Gram-festés is bizonyos esetekben segítség lehet. Tusfestéssel jól vizualizálható a *Cryptococcus* fajok tokja.

A Sabouraud agaron vagy más, gombák tenyésztésre és/vagy identifikálására alkalmas táptalajon kitenyészett gombák morfológiai azonosítása makro- és mikromorfológiai vizsgálatokat foglal magában. Ennek során vizsgálják a pigmentképzést, a gombák eltérő hőmérsékleten végbemenő növekedését, telepmorfológiát, illatát. A mikromorfológiai vizsgálatok magukban foglalják például a csíratömlő-képzést, szintén határozó bélyeg lehet a fonal, álfonal, chlamydoconidium, spóra, arthroconidium, tok megléte vagy hiánya, morfológiája. Rendelkezésre állnak különböző, a kereskedelmi forgalomban készen kapható táptalajok, táptalajalapok (pl. CHROMagar Candida /Becton Dickinson/), melyek alkalmazása segíti a pontosabb identifikálást. A makroszkópos, mikroszkópos vizsgálatok gyakran már kellő információval bírnak a gyakrabban előforduló fajok esetében a species meghatározásához, de ehhez szükséges a vizsgálatot végző személy rutinja, szaktudása.

Bizonyos esetekben szükség lehet további vizsgálatokra. A biokémiai reakciók (pl. szénhidrát-asszimiláció, -fermentáció, ureáz-aktivitás, nitrát-felhasználás stb.) alapján történő azonosítás is elterjedt a rutin mikológiai diagnosztikában, melynek automatizált változatai lerövidíthetik a leletátfordulás idejét. Napjainkban az állatpatogenitási próbák háttérbe szorultak.

A tenyésztési módszerek előnye, hogy a kezünkben van a beteg „saját” izolátuma, melyből célzottan tudunk érzékenységvizsgálatot végezni a különböző antifungális szerek iránt. Ez történhet korongdiffúziós módszerrel, mely a lassabban növekvő törzseknél nem alkalmazható. A leves makro- és mikrohígítási módszerek anyag- és időigényesebbek csakúgy, mint az agarhígítás, mellyel azonban több izolátum tesztelhető egyszerre. A leginkább elterjedt minimális gátló koncentráció meghatározó módszer a gradiens diffúziós metodika (Etest /bioMérieux/). Az érzékenységvizsgálati eredmények interpretálásához a CLSI és az EUCAST is támpontot nyújt [14].

A hagyományos mikrobiológiai módszerek alacsony szenzitivitása és a gombák lassú tenyésztetősége miatt szükséges, hogy gyors, specifikus, magas érzékenységgű módszereket fejlesszenek ki a szakemberek. A Real-Time PCR és LCR az amplifikált gomba nukleinsav detektálására használhatók. A PCR és az SSCP technika együttes alkalmazása ígéretesnek látszik a klinikailag fontos opportunist gombák diagnosztikájában. A gombák PCR-vizsgálatának előnye, hogy gyors, néhány óra alatt megvan az eredmény, de hátránya, hogy érzékeny a kontaminációra, mely akár a laboratórium levegőjéből is származhat. További nukleinsav alapú módszer a PNA-FISH, melynek előnye a gyorsaság, így valamivel korábban nyújt segítséget az antifungális terápia megválasztásában. Kivitelezéséhez azonban pozitív hemokultúra szükséges, így „csak” a tenyésztési időt tudjuk vele megspórolni. A DNS tipizálási eljárások közül a leginkább elterjedtebb a PFGE, RFLP, RAPD és a Southern Blot technika. Ez utóbbi módszerekkel biztató hazai eredmények is születtek már.

A MALDI-TOF készülékkel történő azonosítás egy fehérje extrakción alapuló folyamat. Hatékonyságáról megoszlanak a vélemények: baktériumok esetében megbízhatóbb, míg gombák esetében sikerességét behatárolja az alkalmazott protokoll. Gyors módszer, ám ennek, illetve a korábban említett molekuláris módszereknek az alkalmazása a magas költségek és a nagy mintaszám miatt jelenleg még korlátozott a rutin mikrobiológiai laboratóriumi diagnosztikában.

A gombás fertőzések korai vagy fulmináns szakaszában oldott antigének figyelhetők meg a vérben és egyéb testnedvekben. Ebben az esetben a keringő antigének

jelenléte teszi lehetővé a diagnózist. A szerológiai módszerek változatosak, alapvetően agglutinációs, precipitációs és egyéb technikák. A következő módszerek a legelterjedtebbek: komplementkötési teszt, immundiffúzió, -fluoreszcencia, csőagglutináció, ELISA, RIA. A kereskedelemben elérhető néhány olyan kit, melyek megbízható eredményt adnak, míg másokkal problémák vannak pl. érzékenység szempontjából. [15-19]

6. Terápia

Az antifungális szerek kifejlesztése problémás volt, mert eukarióta gazdaszervezetben szelektíven kellett elpusztítani egy másik eukariótát. Három lehetséges módot sikerült kifejleszteni a gombák hatástalanítására. Egyes antifungális szerek a gombasejt membránját támadják, másik típusba tartozók a gombasejt organellumainak összeszerelődését gátolják, és a harmadik csoportba tartozók gombasejtfal-szintézis inhibitorok.

A polyének membránt károsító antimikotikumok, melyek beépülve az ergoszterolt tartalmazó sejtmembránba pórusokat képeznek, megváltoztatva a membrán permeabilitását. Legismertebb ilyen vegyület az amphotericin B, mely hatásos sarjadzó és fonalas gombák ellen, kivéve a *Trichosporon beigeli*, *C. lusitaniae* és *C. guilliermondii* fajokat, melyek primer rezisztenciával rendelkeznek. Az amphotericin B-t súlyos, életveszélyes fertőzések (pl. peritonitis) vagy szisztémás gombafertőzések kezelésére alkalmazzák főként csökkent immunműködésű betegek esetében. Kombinációs terápiára való felhasználása is ismert, szinergista hatású fluocytosinnal vagy fluconazzal kombinálva. Mivel máj- és vesekárosító hatása is igen jelentős, manapság liposzómás vagy lipid-asszociált formáit igyekeznek alkalmazni, amennyiben ezt a költségvetés lehetővé teszi.

Az azolok az ergoszterol bioszintézisért felelős enzimet gátolják. A ketoconazol és a miconazol az imidazolok, míg a fluconazol, az itraconazol és a voriconazol a triazolok csoportjába tartozik. Leggyakrabban a fluconazolt használják lokális és szisztémás fertőzések esetében. A fluconazol alkalmas többek között a candidaemia, disszeminált candidiasis, gomba okozta meningitis kezelésére. Bizonyos *Candida* fajok (pl. *C. krusei*, *C. inconspicua*) természetes rezisztenciával bírnak ezen azollal szemben. A voriconazol ezen fajok ellen is hatékony.

Az 5'-fluorocytosin a gombák RNS-szintézisét gátolja, és szisztémás infekciók kezelésére alkalmas. Hatása főként *Candida* és egyes fonalas gombák (*Aspergillus*) ellen irányul.

A sejtfallszintézist gátló echinocandinok a β -D-1,3-glükán-szintetázt gátolják, és hatékonyak az élesztők és néhány fonalas gomba ellen [20, 21].

II. Célkitűzések

A gombák okozta véráram-infekciók száma növekvő tendenciát mutat, kimenetelük bizonytalan, halálozási rátájuk magas. Különböző tünetek és elváltozások infekció gyanúját kelthetik, de ezek általában nem specifikusak. A fertőzések kiváltásában a *Candida* genus tagjai töltenek be vezető szerepet a publikált adatok szerint.

Munkánk alapvető célja, hogy megvizsgáljuk az SZTE klinikáin a mikrobiológiailag igazolt véráram-fertőzéseket epidemiológiai szempontból, és a kapott adatokat összevetjük a nemzetközi irodalomban fellelhetőkkel. A gombák okozta véráram-fertőzések monitorozására szükség van annak érdekében, hogy a klinikai szakemberek információt szerezzenek a helyi trendekről, és összehasonlításokat tehessenek globális szintű adatokkal [22].

Másik fontos célunk, hogy molekuláris biológiai módszerrel (PFGE) elvégezzük a felnőtt intenzív osztályokon hospitalizált, mikrobiológiailag igazolt, vagy csak klinikailag feltételezett, szisztémás gombainfekcióban szenvedő betegek különböző mintáiból kitenyészett sarjadzó gombák tipizálását. A PFGE lehetővé teszi az elkülönítését az élesztő kromoszómális DNS-nek, melyet felhasználnak a *Candida* fajok precízebb azonosítására és az egyes klónok differenciálására. Segítségével információt nyerhetünk a patogén törzs eredetéről is.

További célunk, hogy az izolátumok morfológiai módszerekkel történő identifikálási eredményeit összehasonlítsuk a MALDI-TOF készülékkel kapott eredményekkel, s megállapításokat tegyünk a MALDI-TOF megbízhatóságáról gombák vizsgálata szempontjából. A szakirodalom megoszló véleménnyel bír a készülék eredményességét illetően, így saját tapasztalataink alapján következtetéseket vonhatunk le a készülék hasznosságáról a rutin laboratóriumi diagnosztikában. Ehhez kapcsolódóan a tesztelt, rutin mikrobiológiai laboratóriumi diagnosztikánk során alkalmazott protokoll, illetve a diagnosztikai módszerek revidiálása és optimalizálása is célunk.

III. Anyagok, módszerek

1. Az izolátumok eredete

A vizsgálataink során alkalmazott gombaizolátumok a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézetébe 2012. júniusa és 2014. márciusa között érkező mintákból származtak. A humán eredetű klinikai minták vételezése a laboratórium „Minőségirányítási Kézikönyv Mellékletei” című dokumentumában foglalt „Mintavételi Útmutató” alapján történt a hospitalizáció helyén [23]. Az általunk vizsgált törzsek hemokultúrából, légúti mintákból, székletből, vizeletből, sebváladékokból, intraoperatív és testfelszíni mintákból, valamint nyálkahártya-törlésekből származtak. A mintákat a rutin diagnosztika során Sabouraud chloramphenicol agarra inokulálják. A tenyészeteket 24 óráig 37 °C-on, majd további 6 napig szobahőmérsékleten inkubálják. A kitenyészett törzsek identifikálását, a vegyes tenyészetek törzseinek izolálását, azonosítását az Intézet Parazitológiai-Szerológiai-Mikológiai Részlegén végeztük.

2. Tenyésztésen alapuló metodikák

Az adott klinikai szituációban patogénnek minősített sarjadzó gombák identifikálásának első lépése a csíratömlőképzés vizsgálata. A Sabouraud chloramphenicol agaron domború, fehér színű, matt, épszelű telepeket képező izolátumok 1-1 telepét 500-500 µl humán szérumba szuszpendáljuk, és 37 °C-on 2,5-3 óra hosszáig inkubáljuk. A csíratömlőképzés meglétét vagy hiányát fénymikroszkóppal 400 x-os nagyítással vizsgáljuk.

Minden törzsből 1-1 telepet laza hullámvonalban rizsagarra (Difco) szélesztünk, és steril fedőlemezzel fedjük. Szobahőmérsékleten 24-72 óráig inkubáljuk, és 400 x-os nagyítással nézzük a mikromorfológiai sajátosságokat. A csíratömlőt nem képező törzsek izolált telepéből a rizsagar mellett tenyészetet készítünk a kereskedelmi forgalomban készen kapható CHROMagar Candida táptalajra (Becton Dickinson).

Azon törzsek esetében, amelyeket a fenti metodikák alapján nem sikerül egyértelműen azonosítani, biokémiai vizsgálatot végzünk. Ezt a BIO-RAD cég által gyártott AUXACOLOR 2 kittel kivitelezük a kitleírásban foglaltaknak megfelelően [24]. A kitben preformált cukrokhoz, szubsztrátokhoz hozzáadjuk az adott törzsből elkészített szuszpenziót. A negatív kontrollhoz viszonyítva vizsgáljuk az indikátor színváltozását az

egyes rekációelegyekben naponta a 24-72 órás, 30 °C-os inkubáció során. A kitleírás segítségével leolvassuk az eredményeket.

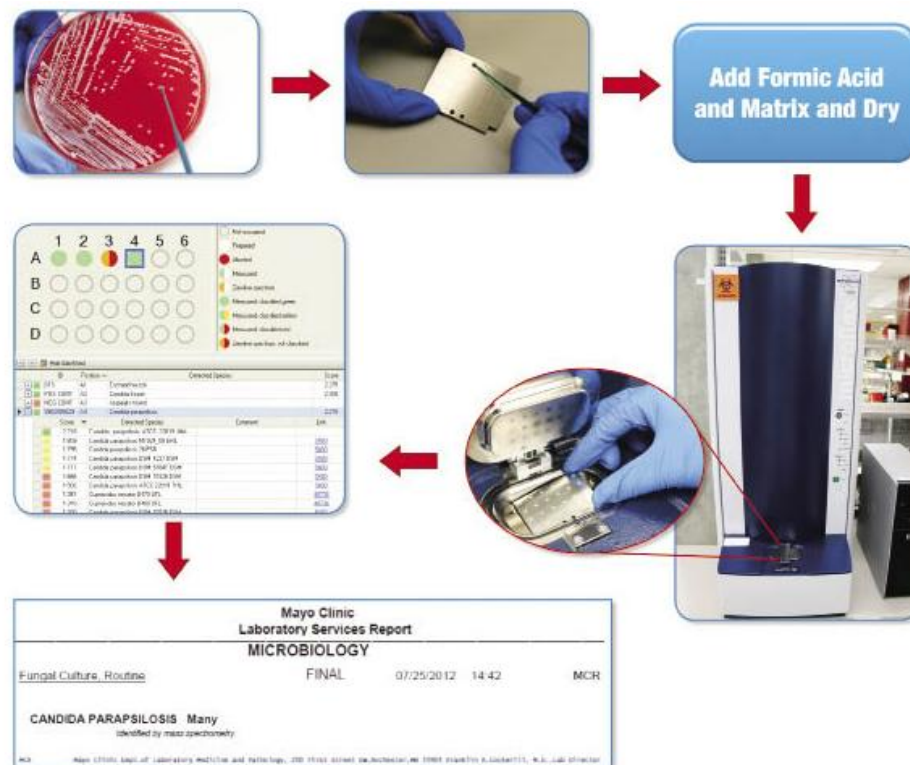
A tenyésztésen alapuló identifikálási módszereket mindig együttesen, komplexen értékeljük, a végeredményt soha nem egy módszer alapján adjuk ki.

Az antifungális szerek iránti érzékenységet a laboratóriumban Etest módszerrel (bioMérieux) végezzük RPMI 1640 agarlemezen. Rutinszerűen a steril testtájokról származó izolátumokat teszteljük. A törzsből steril foszfátpufferben (PBSA-ban) elkészített 0,5 McFarland-es szuszpenzió 100 µl-nyi mennyiségét egyenletesen eloszlatjuk az agarlemez felszínén. Tíz perc szikkadás után óvatosan, egy mozdulattal ráhelyezzük a tesztcsíkot az inokulált felszínre úgy, hogy légbuborék ne kerüljön alá, és lehetőleg ne is mozdítsuk el! Szobahőmérsékleten addig inkubáljuk, míg a MIC-értéket le nem tudjuk olvasni (24-48 esetleg 72 óra). A MIC-érték az antimikotikum azon legkisebb koncentrációja, mely gátolja a gomba növekedését. Fungisztatikus szereknél (pl. azoloknál) a 80 %-os, fungicid szereknél (pl. amphotericin B) a 100 %-os gátlásnál olvassuk le a MIC-értéket [25]. Az eredmények interpretálása az EUCAST és a CLSI előírásainak megfelelően történik [26, 27].

3. MALDI-TOF készülékkel történő azonosítás

A vizsgálathoz élesztőgombák esetén Sabouraud chloramphenicol táptalajon nőtt 24 órás tenyészetet használunk. A minták preparálása során a teljes extrakciós módszert alkalmazzuk. Eppendorf-csövekbe pipettáztunk 300-300 µl desztillált vizet. A vizsgálandó törzs egy izolált telepét beleszuszpendáljuk, majd vortex segítségével alaposan homogenizáljuk. Kilencszáz mikroliter etanolt pipetázunk bele, és ezzel is vortexeljük legalább 1 percig. Centrifugáljuk a szuszpenziót 2 percig 13000 rpm fordulattal, majd eltávolítjuk a felülúszót. Ezt a lépést még egyszer megismételjük. Hozzáadunk 15 µl 70 %-os hangyasav-oldatot az üledékhez, utána vortexeljük, majd azonos mennyiségű (15 µl) 100 %-os acetonitrilt adunk hozzá, és ezzel is összekeverjük. Ismételten centrifugáljuk a mintákat 2 percig 13000 rpm fordulaton. A felülúszóból 1 µl-t egy MALDI-targetre pipetázunk, és hagyjuk a mintát szobahőmérsékleten megszáradni. A mintákra 1 µl mátrix oldatot pipetázunk, és hagyjuk, hogy a felvitt minták szobahőmérsékleten megszáradjanak. (A minta száradása után a mátrixot 10 percen belül hozzá kell adni.) A minta ezzel készen áll az elemzésre. A MALDI-targetet a MALDI-TOF tömegspektrométer készülékbe helyezzük, és a készülék megfelelő paramétereinek beállítása és ellenőrzése után elindítjuk a mérést. A Bruker Biotyper rendszer 2 fontos

programot foglal magában, mely az identifikáláshoz nélkülözhetetlen, így a Flex Control-t a fehérje spektrum beállításához, valamint a Biotyper Real-Time Classification-t az automatizált spektrális analízishez [28,29]. A MALDI-TOF munkalépéseit az 1. ábrán bemutatott képek jól szemléltetik.



1. ábra. A MALDI-TOF általi identifikálás munkafolyamatának lépései (<http://www.mayomedicallaboratories.com/articles/communique/2013/01-maldi-tof-mass-spectrometry/index.html>)

A MALDI-TOF MS identifikáció egy a gyártó által meghatározott log score rendszeren alapul. A 2,0 log score feletti érték a fajsztíű meghatározást jelenti, 1,7-2,0 közötti érték nemzetségsztíű identifikálást ad, míg az 1,7 alatti eredmények nem megbízhatóak a rendszer szerint. Az értékekhez színekódok is tartoznak: zöld színekód felel meg a 2,0 feletti értéknek, a sárga 1,7 és 2,0 közöttinek, és a piros 1,7 alatti értékhez tartozik. A piros színekód egy másik esetben jelölheti az identifikálás eredménytelenségét, ilyenkor a „no peaks found” kiírással találkozhatunk, és a kapott log score értéke ebben az esetben <0.

4. Galaktomannán antigénkimutatás

Az *Aspergillus* galaktomannán antigénkimutatást ELISA-módszerrel végezzük a kereskedelmi forgalomban kapható PLATELIA *ASPERGILLUS* Ag 62794 (BIO-RAD) kittel a benne található leírásnak megfelelően [30]. A vizsgálat szérumból és alsólégúti mintákból is kivitelezhető. Az előírásnak megfelelő mintaelőkészítés után a mintákból és a kontrollokból 50-50 µl-ket pipetázunk az ELISA lemez mélyedéseibe, melybe előzőleg 50 µl konjugátumot mértünk. Lefedve 37 °C-on 90 percig inkubáljuk, majd a felesleget mosási lépésekkel elimináljuk. Kétszáz mikroliter szubsztrátoldatot mérünk minden lyukba. Sötétben szobahőmérsékleten (+18-25 °C) 30 percig inkubáljuk. Az inkubáció befejeztével 100-100 µl stop oldatot mérünk minden mélyedésbe. Az optikai denzitást 450/620 nm-en mérjük.

5. Molekuláris biológiai vizsgálatok (PFGE)

A vizsgálat a Fodor E., és munkatársai által alkalmazott metodika módosításával történt [31].

5.1. A PFGE-hez szükséges törzsoldatok összetétele:

YEPD tápfolyadék:

0,5 % élesztőkivonat, 1 % pepton, 1 % glükóz,

Mosófolyadék: 10 mM TRIS (pH 9,0), 5 mM EDTA, 0,1% 2-mercaptoetanol

Protoplaszt preparáláshoz: 1 M KCl, 2 % csigaenzim, 0,01 % lysing enzime (*Trichoderma harzianum*, Sigma)

Inkubációs puffer (pH 9,5): 0,5 M EDTA, 10 mM TRIS-HCl, 1 % Na-lauril-sarcosine, 1 mg/ml Proteinase K

TBE puffer (0,5 x): 45 mM TRIS, 45 mM borát, 50 mM EDTA

5.2. Intakt kromoszómális DNS preparációja

A *Candida* törzseket Sabouraud chloramphenicol agaron növesztjük. Kiválasztunk egy szeparált telepet, és 20 ml YEPD tápoldatba inokuláljuk. Húsz óráig 37 °C-on inkubáljuk rázatva. Centrifugáljuk a sejteket 10 percig 3000 rpm fordulaton, ezt követően mossuk 20 ml desztillált vízben, majd ismételten fugálunk 10 percig 3000 rpm fordulaton. A sejteket felfuszpendáljuk 20 ml mosófolyadékban, és inkubáljuk 20 percig.

Protoplasztok készítése: A sejteket ismételt 10 perces 3000 rpm-es centrifugálással kiülepítjük, és felfuszpendáljuk 20 ml csigaenzimes-emésztő oldatban. Inkubálunk 30 °C-on 1 óráig. A protoplasztokat 3000 rpm-en történő 10 perces centrifugálással összegyűjtjük, és kétszer mossuk 20 ml 1M KCl oldatban. A protoplasztokat felfuszpendáljuk 250 µl 125 mM EDTA oldatban, s hozzáadunk 1 %-os agarózt, (Type VII agarose, Sigma, Germany) melyet 125 mM EDTA-val oldunk fel. Agarózblokkot készítünk, melyet inkubációs pufferbe helyezünk, és inkubáljuk 52 °C-os vízfürdőben. Huszonnégy óra múlva kicseréljük az inkubációs oldatot, majd újabb 24 óra múlva 1 ml 50 mM EDTA-val mossuk a mintákat. Végül 4 °C-ra helyezzük a további felhasználásáig.

5.3. PFGE

Az agarózblokkokat 1 %-os kromoszómális agaróz (BIO-RAD) gélbe töltjük, és behelyezzük a CHEF-féle apparátus elektroforézis kamrájába 0,5 x TBE pufferrel. A DNS molekulák szeparációjához egy állandó 14 °C-os hőmérsékletet állítunk be. A kromoszómális DNS-t CHEF-DR II (BIO-RAD) apparátusban szeparáltuk. Az elektroforézis körülményei a következők voltak: 90 mp/ 24 h és 325 mp/24 h, 4 V/cm és 120°. Elektroforézis után a gél 45 percig etídium-bromiddal festjük, 15 percig differenciáljuk desztillált vízzel, majd 254 nm-en UV fény alatt láthatóvá tesszük a sávokat [32, 33].

A rendelkezésre álló idő alatt csupán 4, random módon kiválasztott betegnél sikerült értékelhető eredményekhez jutni. Mind a 4 vizsgált személy klinikailag feltételezett szisztémás gombainfekcióban szenvedett, mert esetükben a hemokultúra tenyésztés mikrobiológiailag nem igazolta a szisztémás fertőzést. (A 2 nő és 2 férfi átlagéletkora 64 év volt.) Összesen 24 mintájukból származó 31 izolátumukat teszteltük: 21 *C. albicans*, 9 *C. glabrata* és 1 *C. parapsilosis*. (1. táblázat)

Minta típusa	Izolált törzs (db)
trachea	<i>C. albicans</i> (5), <i>C. glabrata</i> (1)
inguinalis	<i>C. albicans</i> (2)
hónalj	<i>C. albicans</i> (1)
torok	<i>C. albicans</i> (4), <i>C. glabrata</i> (1)
orr	<i>C. albicans</i> (1), <i>C. parapsilosis</i> (1)
gyomortartalom	<i>C. albicans</i> (3)

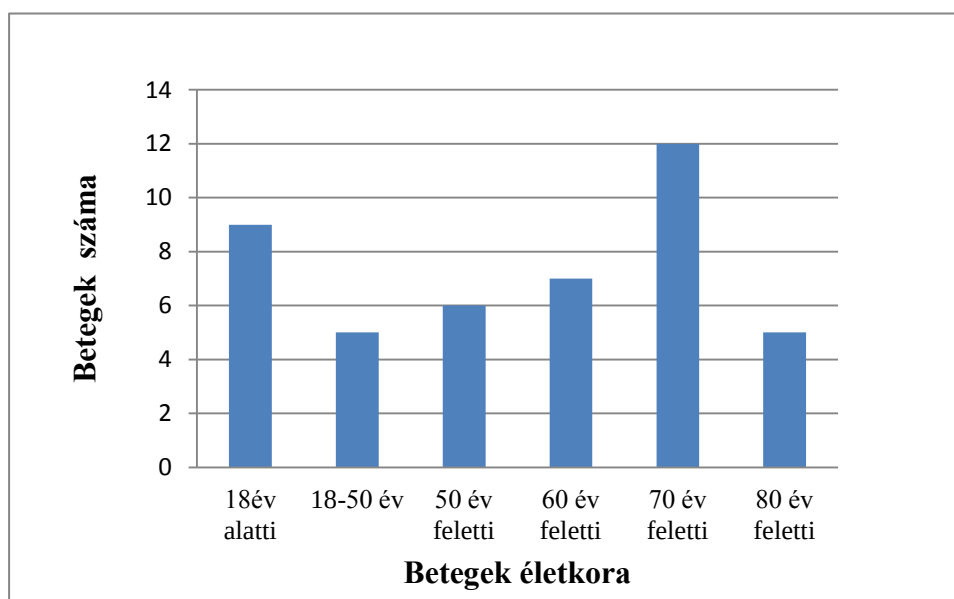
anális törlés	<i>C. albicans</i> (1)
hólyagbennék	<i>C. albicans</i> (1), <i>C. glabrata</i> (2)
széklet	<i>C. albicans</i> (3), <i>C. glabrata</i> (5)

1. táblázat: A PFGE-vel vizsgált gombatörzsek származása

IV. Eredmények

1. Epidemiológiai vizsgálatok eredményei

2012. júniusa és 2014. márciusa között 44 beteg esetében talákoztunk gomba-pozitív hemokultúrával. A betegek mintái a Szegedi Tudományegyetem különböző klinikáiból érkeztek a hospitalizáció helyétől függően. A legtöbb izolátum a felnőtt intenzív osztályokról és Gyermekklinikáról érkezett mintákból származott, azonban tenyésztettünk gombát a Nefrológia, Kardiológia, Bőrklinika, Szívsebészet és az Onkoterápiás egységekből kapott hemokultúrákból is. Az érintett betegek között 18 férfi (41 %) és 26 nő (59 %) volt. A legfiatalabb beteg 2 hetes volt, míg a legidősebb személy a 87. életévében járt a vizsgálatkor. A betegek átlagéletkora 53 év volt. A véráram-fertőzés a betegek életkor eloszlását tekintve leginkább a gyerekeknél és az idős személyeknél kiugró, míg a középkorú rétegben az előfordulási arányok stagnálnak. A leginkább érintett korcsoport a 70 és 80 év közötti idős személyek. Részletes adatokat a 2. ábrán szemléltettük.



2. ábra: A hemokultúra gomba-pozitív betegek életkor szerinti megoszlása

A gombás fertőzések kialakulásának valószínűségét növelik bizonyos rizikófaktorok és a betegek részéről hajlamosító tényezők. A vizsgált személyek között leggyakrabban a hosszas kórházi tartózkodás (intenzív osztályok), elhúzódó antibiotikum terápia, immunrendszert érintő alapbetegségek (pl. perifériás T-sejtes lymphoma) voltak a rizikófaktorok. A megfigyelt 44 személy esetében a hemokultura palackok pozitivitási ideje 3 és 129 óra között ingadozott, a medián 30 órának bizonyult. Az egyes palacktípusokat és a hozzájuk tartozó pozitivitási időt, valamint a belőlük izolált gombafajokat az 2. táblázatban részleteztük.

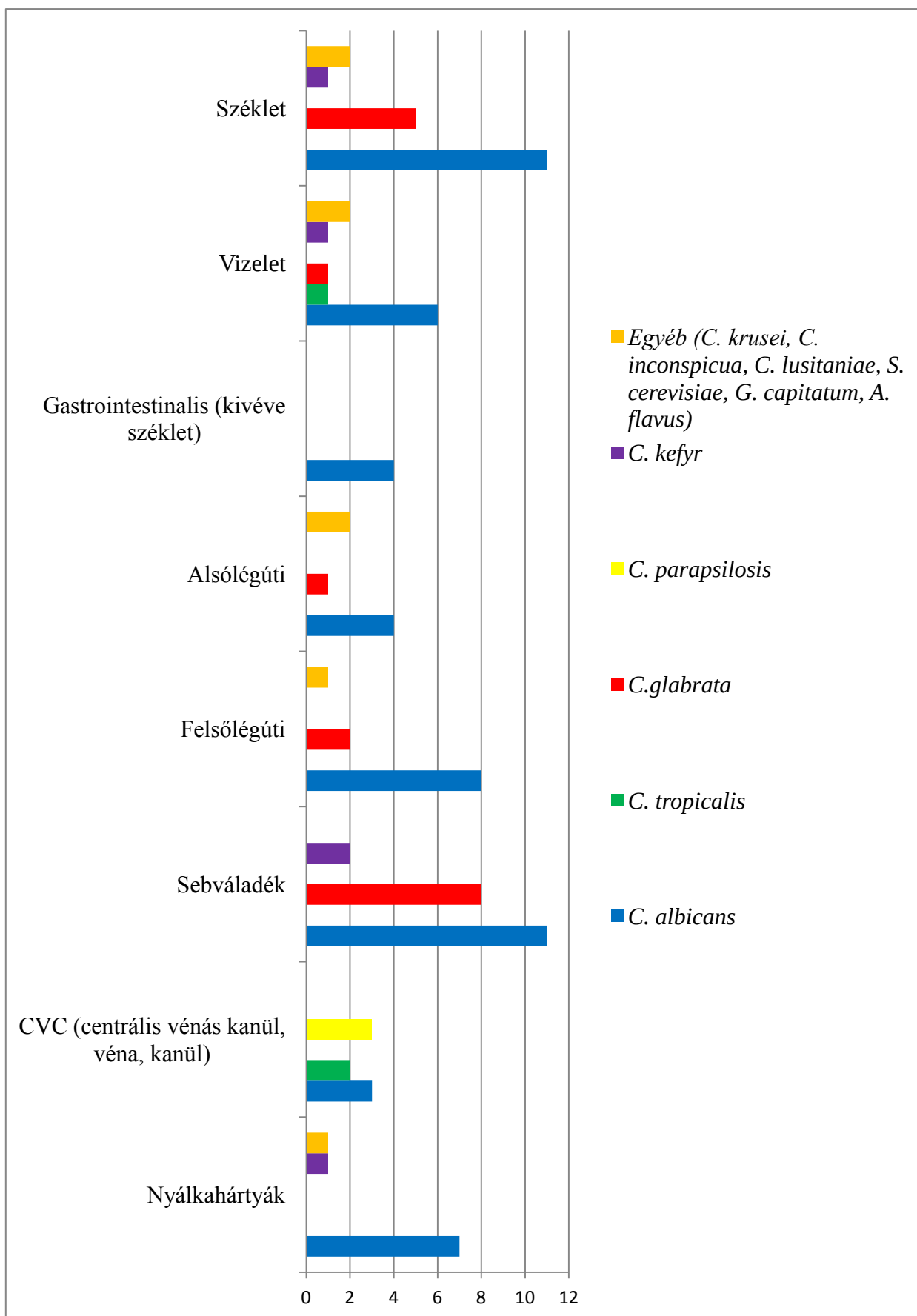
Hemokultura palack típusa	Pozitivitási idő (tól-ig)/ átlag idő (h)	Kitenyészett fajok
Hemokultura aerob	11-79 /36	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. parapsilosos</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Geotrichum capitatum</i>
Hemokultura anaerob	11-24/18	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. glabrata</i>
Hemokultura aerob antibiotikumkötős	4-129/33	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. glabrata</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>G. capitatum</i> <i>Pichia fabianii</i> <i>Trichosporon asahii</i>
Hemokultura anerob antibiotikumkötős	4-127/46	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>P. fabianii</i>
Hemokultura Pediatric	8-44/21	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. parapsilosis</i>

Hemokultúra gomba	3-79/31	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>F. oxysporum</i> <i>G. capitatum</i>
-------------------	---------	--

2. táblázat: Hemokultúra palacktípusok pozitivitási adatai

A 44 vizsgált beteg közül 41 fő esetében fordult elő candidaemia. A leggyakoribb izolált kórokozó a *C. albicans* (27 epizód) volt, második leggyakoribb fajok a *C. glabrata* és a *C. tropicalis* (5-5 eset), ezeket követte a *C. parapsilosis* (4 eset). Hét beteg hemokultúráiból egyéb gombafajok (*F. oxysporum*, *S. cerevisiae*, *G. capitatum* és *P. fabianii*) tenyészttek ki. Két vagy több faj okozta véráram-infekció 3 esetben igazolódott: az első esetben *C. albicans*, és *C. glabrata*, a második esetben *C. albicans*, *C. glabrata* és *C. tropicalis*, és a harmadik esetben *C. albicans* és *C. parapsilosis* volt izolálható, mint koinfektív kórokozó.

Megvizsgáltuk gomba-pozitív hemokultúrával rendelkező beteg egyéb mintáiból kitenyésztett gombákat is. Eredményeinket a 2. ábrán szemléltetjük. Amint az látható, a *C. albicans* minden mintatípusból izolálható. A *C. glabrata* a székleten kívül főként légúti és invazív mintákban fordult elő, míg a *C. parapsilosis* a bőrflóra tagjaként inkább az ezzel összefüggő centrális vénás kanülökből tenyésztett ki. (3. ábra)



3. ábra: A 44 véráram-fertőzött betegek egyéb mintáiból izolált fajok előfordulási gyakorisága

A hemokultúra izolátumok antimikotikumok iránti érzékenységvizsgálatának eredményeit a 3. táblázatban foglaltuk össze.

Fajnév	Antimikotikum	MIC értékek
<i>C. albicans</i>	amphotericin B caspofungin fluconazol itraconazol myconazol voriconazol	0.004-32 0.064-32 0.064-256 0.032-32 0.004-0.125 0.004-32
<i>C. glabrata</i>	amphotericin B caspofungin fluconazol itraconazol myconazol voriconazol	0.016-1 0.5 0.25-256 0.016-32 0.008-0.016 0.25-1
<i>C. tropicalis</i>	amphotericin B caspofungin fluconazol itraconazol myconazol voriconazol	0.016-1 0.125-0.25 0.25-2 0.032-32 0.064 0.016-0.125
<i>C. parapsilosis</i>	amphotericin B caspofungin fluconazol itraconazol myconazol voriconazol	0.016-4 0.5-2 0.125-16 0.032-0.25 0.25-2 0.004-0.125

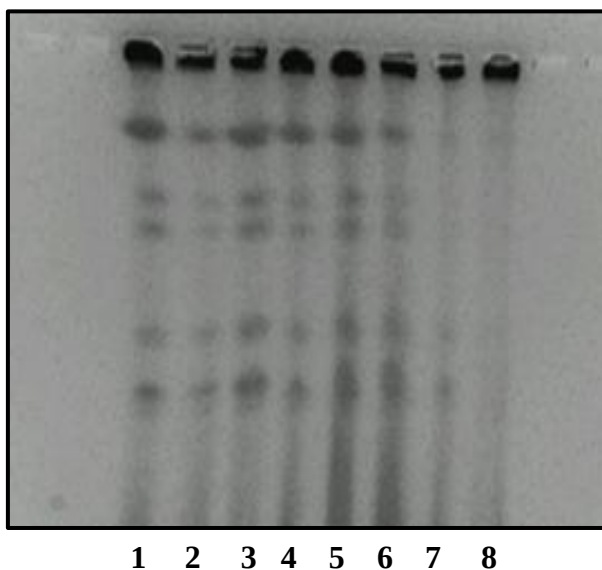
3. táblázat: Hemokultúrából izolált sarjadzó gombák antifungális érzékenységi adatai (MIC: minimális gátló koncentráció)

A négy leggyakrabban előforduló *Candida* faj mindegyike rezisztens volt, valamilyen azol típusú antimikotikumra, főként az itraconazolra. Itraconazol rezisztenciát tapasztaltunk a legnagyobb arányban. Fluconazol rezisztencia volt a második leggyakoribb az izolátumok között, és a caspofungin rezisztencia a harmadik. A „gold standardnak” tartott amphotericin B-vel szemben a *C. albicans*, és a *C. parapsilosis* produkált rezisztenciát. *C. albicans* esetében azol keresztrezisztenciát tapasztaltuk (itraconazol, voriconazol, fluconazol), valamint ellenálló-képességet mutatott az amphotericin B-vel és a caspofunginnal szemben. A legérzékenyebb fajnak a *C. tropicalis* minősült, mely csak itraconazol mellett mutatott rezisztenciát, nagyon csekély arányban.

A vizsgált személyek közül 5 betegről álltak rendelkezésre részletesebb információk a terápiát és a kimenetelt illetően is. Közülük 4 személy részesült antimikotikum kezelésben: 2 beteg caspofungint, 2 pedig fluconazolt kapott. A terápia 4 esetben nem járt sikerrel, mind a 4 beteg elhalálozott.

2. A molekuláris biológiai vizsgálatok eredményei

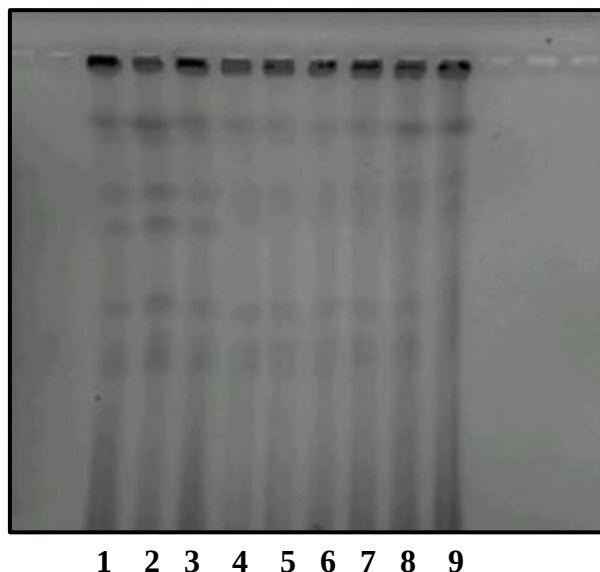
A fenti molekuláris módszerrel összesen 4 személy 24 mintájából izolált *Candida* törzsek kariotipizálását végeztük el. A 4. ábra egy beteg különböző testtájairól származó 7 *C. albicans* törzset mutatja, az utolsó sávban (8.) a kontrollként használt *C. albicans* törzssel. A 7. sávban futó DNS bandek kevésbé jól láthatók, azonban az első hat sávban látható azonos mintázatok alapján megállapítottuk, hogy azonos elektroforetikus kariotípust határoztunk meg a különböző izolátumokból. Ezen beteg esetében nem feltételeztünk a látottak alapján az exogén úton történő fertőződést, a kariotípus hasonlóság alapján ugyanazon törzs általi kolonizációt állapítottunk meg.



4. ábra: Egy adott beteg különböző testtájairól származó *C. albicans* törzsek elektroforetikus képe

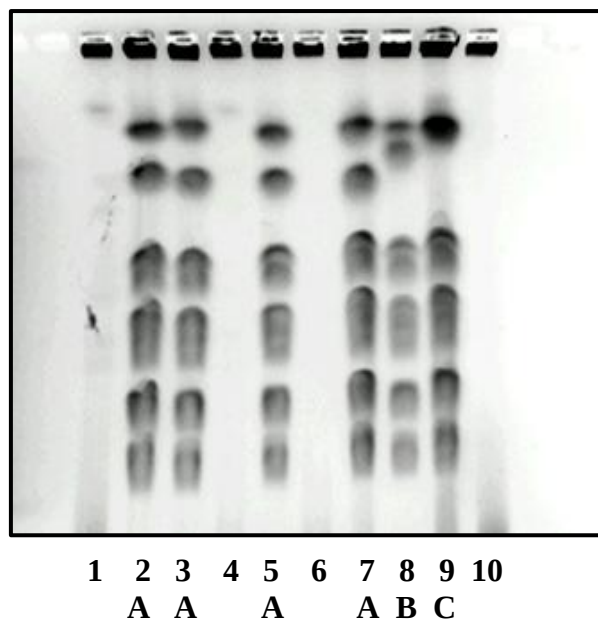
Az 5. ábrán 2 különböző beteg mintáiból izolált *C. albicans* törzsek elektroforetikus kariotípusa látható. Az első 3 sávban az egyik beteg, a 4-9. sávban a másik beteg izolátumainak „DNS- ujjlenyomatát” láthatjuk. A gélkép minősége ellenére úgy véltük, hogy egy elektroforetikus kariotípus volt megfigyelhető páciensenként, azaz ugyanaz a törzs kolonizációja lépett fel mindkét esetben, és ennél fogva ebben a két esetben is elvetettük az esetleges külső forrásból származó fertőzés lehetőségét. A fő bandek molekuláris méretének ismerete nélkül, vizuális alapokra helyezve értékelésünket arra a

következtetésre jutottunk, hogy a 3 beteg összesen 16 különböző mintáiból izolált *C. albicans* törzsek 3 különböző elektroforetikus kariotípusát határoztuk meg.



5. ábra: Két különböző beteg mintáiból izolált törzsek DNS profilja (1-3. sávok az egyik beteg, a 4-9. sávokban a másik betegtől származó törzsek)

A 6. ábrán egy, az előzőektől különböző beteg mintáiból származó *Candida* fajok elektroforetikus gélképe látható. Az 1., a 4. és a 6. sávokban *C. albicans*, míg a 2., 3., 5., 7-9. sávokban *C. glabrata* szerepel. A 10. sávban a kontrollként alkalmazott *C. albicans* törzs látható. A gélkép eredményeiből, valamint a protoplasztképzés munkafolyamatának monitorozása során azt a következtetést vontuk le, hogy a 4 óráig tartó protoplasztképzés kedvezőtlen a *C. albicans* számára, s a túl sokáig tartó emésztésnek tudható be a DNS molekulák elvesztése, és a gélelektroforézis sikertelensége. A protoplasztok létrehozása során folyamatosan követtük annak fázisait, és a *C. glabrata* specieseknél azt tapasztaltuk, hogy a *C. albicans*-szal ellentétben nem elégséges az 1 óra, hanem 3-4 óra szükséges a megfelelő protoplasztok képzéséhez, ennek megfelelően eredményt csak a *C. glabrata*-t tartalmazó izolátumoknál sikerült elérnünk. A gélképen jól látható, hogy a *C. glabrata* 3 különböző kariotípusát (A, B C) sikerült elkülöníteni. Ebben az esetben a külső eredetet tartottuk valószínűbbnek. A beteg adatainak monitorozása során rendelkezésünkre állt olyan háttérinformáció, mely szerint a minták vételének idején a vizsgált beteget katéterezték, és ez megerősítette a feltételezésünket, hogy a B és C kariotípusba tartozó két törzs exogén forrásból származott.



6. ábra: A 4. beteg PFGE-vel vizsgált mintáiból izolált törzsek elektroforetikus képe

3. A morfológiai identifikálási módszerek és a MALDI- TOF eredményeinek összefoglalása

A vizsgált időszakban 160 izolátum azonosítását végeztük el MALDI-TOF MS rendszerrel a teljes extrakciós módszert alkalmazva, és az eredményeket összevetettük az előzetesen megállapított, morfológiai és biokémiai módszerek alapján kapott identifikálási eredményekkel.

A vizsgált izolátumok közül 124 törzsnél (78 %) 2,0 feletti log score értékeket sikerült nyerni, míg 26 izolátumnál (16 %) kaptunk 2,0 alatti értékeket, és 10 esetben (6 %) az identifikálás nem járt eredménnyel. Néhány faj esetében (*C. inconspicua*, *G. capitatum*) konstans jelleggel nagyon alacsony score értékeket kaptunk, vagy egyáltalán nem sikerült az identifikálás. Ennek okai valószínűleg az alap adatbázis hiányosságaiból, vagy hibáiból adódhatnak. *C. inconspicua* speciesnél általános megfigyelésünk volt, hogy a MALDI-TOF MS minden esetben *Pichia cactophila* speciést adta meg eredményként. A MALDI-TOF által vizsgált fajokat, s a hozzájuk tartozó score tartományokat és átlag score értékeket a 4. táblázatban összegeztük, feltüntetve a MALDI-TOF által megadott fajnevekkel.

A hagyományos (morfológiai alapon történő) identifikálás 3 esetben bizonyult hibásnak, amit a MALDI-TOF által kétszer elvégzett identifikálással erősítettünk meg. Az egyik esetben morfológiai alapon a vizsgált species *C. parapsilosis*-ként lett meghatározva, azonban a MALDI-TOF *C. lusitaniae*-t állapított meg. A másik két esetben pedig *C.*

lusitaniae helyett *C. parapsilosis*, valamint *C. metapsilosis* lett volna a helyes faji besorolás, szintén a MALDI-TOF általi megerősítés alapján. Ha összevetjük az eredményeket, láthatjuk, hogy míg a morfológia alapon történő diagnosztika 3 esetben volt sikertelen, addig a MALDI-TOF 10 esetben teljesen eredménytelennek és 26 izolátumnál pedig bizonytalannak minősült.

Fajnév (vizsgált izolátumok száma)	Score- tartomány	Átlag- score	MALDI-TOF által megadott fajnév
<i>C. albicans</i> (55)	1.97-2.47	2.19	<i>C. albicans</i>
<i>C. kefyr</i> (11)	1.76-2.45	2.14	<i>C. kefyr</i>
<i>C. parapsilosis</i> (11)	1.81-2.26	2.14	<i>C. parapsilosis</i> (<i>C. lusitaniae</i>)
<i>C. tropicalis</i> (25)	1.74-2.35	2.03	<i>C. tropicalis</i>
<i>C. glabrata</i> (26)	1.89-2.35	2.15	<i>C. glabrata</i>
<i>C. inconspicua</i> (14)	1.62-1.99	1.83	<i>P. cactophila</i>
<i>C. lusitaniae</i> (4)	1.95-2.21	2.05	<i>C. lusitaniae</i> (<i>C. parapsilosis</i> , <i>C. metapsilosis</i>)
<i>S. cerevisiae</i> (4)	1.64-1.99	1.79	<i>S. cerevisiae</i>
<i>G. capitatum</i> (10)	1.24-1.68	1.35	<i>G. capitatum</i>

4. táblázat: MALDI-TOF identifikálás eredményei, az egyes fajokhoz kapott score-értékekkel

V. Megbeszélés

1. Epidemiológiai adatok értékelése, összehasonlítása a nemzetközi irodalmi adatokkal

A *Candida* fajok okozta véráram-fertőzések alakulását világszerte tanulmányozzák. Az epidemiológiai adatok gyűjtésére szükség van a fajok eloszlásának, valamint az antimikotikumok iránt mutatott változó érzékenységük tanulmányozása szempontjából, hogy a szakemberek a legoptimálisabb terápiát alkalmazhassák, és tájékozódhassanak a lokális és globális trendekről. A candidaemias esetek száma az elmúlt húsz évben emelkedett, és ezzel együtt a fajok eloszlásában is történtek változások. Mivel a gombák

okozta véráram-infekciók morbiditása, mortalitása jelentős, így mindenképpen szükséges a helyi adatok gyűjtése is.

Munkánk célja az volt, hogy értékeljük a Szegedi Tudományegyetem különböző klinikáin 2012 júniusa és 2014 márciusa között előforduló véráram-fertőzött eseteket, és frissítsük a korábban közölt epidemiológiai adatokat. A közel két éves periódus alatt azt tapasztaltuk, hogy a 44 véráram-fertőzött beteg hemokulturáiban leggyakoribb fajként (27 esetben) a *C. albicans* fordult elő. Második leggyakoribbként szerepelt a non-*albicans Candida* fajok közül a *C. glabrata* és a *C. tropicalis*, s harmadikként a *C. parapsilosis*-t határoztuk meg. A SZTE ÁOK Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézetben 1996-2009 között folytatott megfigyelések alapján szintén első helyen említik a *C. albicans*-t, második helyen a *C. glabrata*-t és a *C. parapsilosis*-t, végül harmadik helyen a *C. tropicalis*-t [34]. Egy másik tanulmány, mely 2004 és 2010 között monitorozta a véráram-fertőzött betegeket, szintén első helyen említi a *C. albicans*-t, második helyen a *C. glabrata*-t, harmadik helyen, a *C. tropicalis*-t, mint fő patogént a gombás fertőzések kiváltásában, s ugyanezen tanulmány kiemeli, hogy a leginkább veszélyeztetett betegcsoportok az egy évnél fiatalabb és a 60 évnél idősebb személyek [35]. Ez utóbbi megállapítást a mi eredményeink is igazolják (2. ábra). A nemek megoszlásában nincs jelentős eltérés. Egy átfogó, globális tanulmány rávilágít arra a kérdésre, hogy a *Candida* fajok eloszlása régióként, országonként olykor éles eltéréseket mutat. A tanulmány a 90-es évektől 2011-ig összevetette különböző országok epidemiológiai adatait, s felhívta a figyelmet a non-*albicans Candida* fajok markánsabb előfordulására. Magas előfordulási rátával említi a *C. glabrata*-t az USA-ban, míg a leggyakoribb megfigyelt fajként a latin amerikai és ázsiai-csendes óceáni térség országaiban a *C. tropicalis*-t és *C. parapsilosis*-t említi, míg Európát illetően a *C. glabrata*-t és a *C. parapsilosis*-t emelte ki a tanulmány [36]. A különböző adatok jól tükrözik, hogy a *C. albicans* után egyre nagyobb jelentőséggel fordulnak elő a non-*albicans Candida* fajok közül a *C. glabrata*, *C. tropicalis* és a *C. parapsilosis* fajok. Változó, hogy éppen melyik közlemény melyik fajt közli a második vagy harmadik helyen, azonban a jelentősebb előretörésük a véráram-fertőzések kiváltásában felhívja a figyelmet a megfelelő terápia megválasztására. Az érintett betegek általában intenzív terápiás ellátást igényelnek: ennek tudható be, hogy gomba-pozitív hemokultúrák többsége a felnőtt intenzív osztályokon hospitalizált személyektől származik.

Érdemes megfigyelni, hogy a gombát tartalmazó hemokultúrák a pozitív jelzésig eltelt inkubációs ideje igen tág intervallumok között mozog (2. táblázat). Ez nyilván függ

az inokulációs csíraszámától, azonban további vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy a palack típusa befolyásolja-e ezt a jelenséget. Minden esetre eredményeink szerint a legrövidebb inkubációs időt igényelték az antibiotikumkötős, a gomba és a Pediatric palackok. Ez utóbbi típusnál azért is lenne nagyon szerencsés a feltételezés megerősítése, mert ezekbe a palackokba kisebb mennyiségű vér vétele szükséges a nevéből adódó betegcsoportra való tekintettel.

A vizsgált betegek esetében igazolható volt egyéb testtájak kolonizációja is vagy ugyanazon törzzsel, vagy egyéb törzsekkel, esetleg más fajokkal is (6. ábra). A rizikócsoportba tartozó betegeknek érdemes lenne egy szűrési protokollt kidolgozni, hiszen ez egy későbbi, komolyabb infekció egyik markere is lehet.

Az érzékenységi adatokat tekintve a SZTE ÁOK Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet által 1996 és 2009 között vizsgált törzsek közül a *C. albicans* és a *C. glabrata* rezisztenciáját tapasztalták fluconazol és caspofungin esetében, illetve a *C. tropicalis* az itraconazollal szemben mutatott rezisztenciát. Az általunk megvizsgált *C. albicans* izolátumok között voltak olyanok, melyek rezisztenciát mutattak nem csak fluconazol és caspofungin jelenlétében, hanem amphotericin B-vel, itraconazollal és voriconazollal szemben is. Sikerült kimutatni olyan *C. glabrata* specieseket, melyek fluconazol mellett rezisztensként viselkedtek a caspofungin, itraconazol és voriconazol ellen. Általánosságban megállapítható, hogy 2009-ig rögzített adatokhoz képest mintha növekedne a *Candida* fajok rezisztenciája az antimikotikumokkal szemben, mely az azolok mellett az amphotericin B esetében is figyelemre méltó. Ennek esetleges tendenciózus mivoltának megállapításához természetesen további monitoringra van szükség. Az érzékenységi és rezisztencia adatok meglehetősen heterogének az egyes földrajzi régiókat illetően, így egy standard értékrendszer kialakítására nincs lehetőség. A fokozott antibiotikum használat és a fajok permanens változása eredményezi az egyre agresszívabb és nagyobb ellenálló-képességű fajok terjedését.

2. A molekuláris biológiai vizsgálatok értékelése

A nosocomiális candidaemias esetek száma nőtt az elmúlt évtizedekben a rendelkezésre álló új antimikotikumok ellenére. A hosszas hospitalizáció egyik rizikófaktora lehet a nosocomialis fertőzések kialakulásának. A *C. parapsilosis* a bőrflóra tagja, mely álfonal- és biofilmképzése révén jól tapad a szintetikus felületekhez. Ennek tudható be, hogy az invazív eszközök (katéterek, kanülök) egyre elterjedtebb alkalmazása révén komolyabb infekciót is okoz. Vannak tanulmányok, melyek szerint a *C. parapsilosis*,

C. albicans, *C. glabrata* és *Rhodotorula* fajok, melyek az egészségügyi dolgozók kezén a leggyakrabban fellelhetők, képesek transzmittálódni a dolgozók kezéről a betegekre [37, 38]. Továbbá régóta feltételezik azt is, hogy az újszülöttek körében az invazív candidaemias esetek számának növekedése mögött a horizontális transzmisszió jelensége áll, azaz, hogy a csecsemők a kórházi környezetből gyakrabban szereznek gombát, mint az anyjuktól [39]. A PFGE egy alkalmas technika, hogy a szakemberek vizsgálják a betegek különböző mintáiból kitenyésztett gombák közötti genetikai összefüggést, s vizsgálják a fajok klonális eredetét, a törzsek között esetlegesen fennálló járványtani kapcsolatot.

A PFGE-vel kapcsolatos tanulmányok nem adnak egységes képet az alkalmazott protokollt illetően. Az általunk elvégzett kísérletekhez kezdetben a Fodor E., és munkatársai által közölt metódus alapján dolgoztunk, azonban több eredménytelen próbálkozás után a SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszékén alkalmazott módszer alapján végeztük el kísérleteinket [40]. Eredményeink kevésbé demonstratív volta miatt arra a következtetésre jutottunk, hogy még további kisebb módosításokra, optimalizálásra van szükség, hogy reprezentatívabb és megbízhatóbb adatokat nyerhessünk a későbbiekben. Vizuális kiértékelésünk alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a vizsgált 4 beteg közül 3 esetében, akiknél *C. albicans* fordult elő ugyanazon, vagy más helyről származó izolátumaikban, az endogén-fertőzés lehetősége merült fel. Ezt a feltételezésünket megerősítették korábbi tanulmányok, amelyek arról számolnak be, hogy a *C. albicans* leginkább az endogén fertőzés folyamatában vesz részt, mely a predomináns klonális reprodukcióval magyarázható [41]. Úgy véltük, hogy a *C. albicans* 3 különböző kariatípusát detektáltuk a 3 betegnél, azonban feltevéseinket a DNS molekulák molekuláris méretének meghatározásával nem erősítettük meg. A 4. betegnél felmerült az exogén fertőzés lehetősége, mert a 6 mintából származó *C. glabrata* 4 esetben azonos, míg 2 esetben eltérő DNS profilt mutatott. Ismervén, hogy előfordulhatnak mikroevolúciós folyamatok, melyek egy törzs variációit eredményezhetik, kromoszóma átrendeződés révén, mi fenntartottuk a külső forrásból származó fertőzés tézisé. [42] A feltevésünket erősíti az a tény, hogy a vizsgált beteg hosszas ITO-s tartózkodása során szívkatéterezéssel esett át, mely egyik hajlamosító tényezője egy gombás fertőzésnek.

Fontos hangsúlyoznunk, hogy az eredmények teljes megbízhatóságának hiányában, további célunknak tartjuk a PFGE körülményeinek és az alkalmazott protokollok korrigálását, és opcionálását a pontosabb eredmények elérése céljából.

3. MALDI-TOF és a morfológiai metodikák összehasonlítása

A MALDI-TOF MS megítélése a gombák pontos azonosítását illetően jelenleg is vitatott, hatékonyságát jelentősen befolyásolja az alkalmazott protokoll. Az általunk vizsgált 160 izolátum esetén a MALDI TOF 77 %-ban bizonyult megbízhatónak teljes extrakciós módszert alkalmazva, míg a morfológiai alapon történő identifikálás 98 %-ban bizonyult helyesnek. *C. inconspicua* speciesnél a MALDI-TOF minden esetben *P. cactophila* speciest adta meg eredményként. Feltételezhetően a hibás identifikálás oka a két faj nagyon közeli rokon kapcsolatában keresendő [43]. A hagyományos módszerekkel történő identifikálás szakértelmet kíván, s olykor előfordulhat, hogy hibás, így belátható, hogy szükség van molekuláris technikákra. A MALDI-TOF 77 %-os teljesítménye azonban még nem elégséges a morfológiai alapon történő faj-meghatározás leváltásához. A MALDI-TOF hátránya, hogy bár kevésbé időigényes módszer, de költségeit tekintve meghaladja a hagyományos módszerekét, ami szintén gátat szab szélesebb körű elterjedésének. További hátránya, hogy nem biztosít antimikrobiális érzékenységi adatokat, a tenyészet, amivel dolgozunk, nem lehet 48 óránál idősebb, mert a riboszómális fehérje degradálódhat, s fonalas gombáknál további optimalizálásra van szükség az eltérő fehérje-összetétel miatt [44]. A MALDI-TOF jelenleg egy hatékony, de erősen fejlesztésre és optimalizálásra szoruló technika a mikológiai laboratóriumi diagnosztikában.

A szepszis miatti halálozás 25 %-ról 80 %-ra nőtt az elmúlt évtizedekben, ezért szükséges a szepszis tüneteinek minél korábbi felismerése. Jelenleg folynak kísérletek, hogy a MALDI-TOF miként tudná közvetlenül egy hemokultúra mintából kimutatni a kórokozót, s bár kisebb eredményeket sikerült felmutatni, de egy általánosan elfogadható és megbízható protokoll ezidáig még nem született [45,46]. Egy további felhasználás, az alfaj elkülönítés területén is folynak kísérletek, de a komolyabb eredmények elérése még várat magára e felhasználási területen is [47]. A klinikum szempontjából ennek csekély jelentősége van.

Összességében tehát megállapítottuk, hogy a teljes extrakciós módszer valóban alkalmas mikológiai vizsgálatokra, de a MALDI-TOF ennek ellenére nem helyettesítheti a morfológiai alapon történő diagnosztikát, hiszen ahhoz még túl sok hibalehetőséggel bír. Bár a klinikai mikrobiológusok identifikálásában is előfordulhatnak hibák, azonban egyelőre alkalmasabb a rutin mikológiai diagnosztikára, s prioritást élvez a MALDI-TOF készülékkel szemben. A tömegspektrometria megjelenése a mikrobiológiai diagnosztikában biztató, és a folyamatos fejlesztéseknek köszönhetően egyre inkább

bővülőnek látszik a felhasználási területek köre, de jelenleg még az identifikálást nem lehet csak peptid- tömeg alapon végezni.

VI. Összefoglalás

A gombák okozta véráram-fertőzések száma világszerte növekvő tendenciát mutat, és a szakirodalom egységes a tekintetben, hogy az első helyen említi a *Candida albicans*-t, mint a leggyakoribb opportunistá patogén-sarjadzó gombát, mely fellelhető az érintett betegek mintáiban. A gyors, pontos detekció, az antimikotikum érzékenység vizsgálat, a kolonizáció mértékének követése, epidemiológiai adatok gyűjtése mind segítik a megfelelő kezelési protokoll megválasztását és a racionális megelőző intézkedések kidolgozását.

Munkánk során epidemiológiai adatokat gyűjtöttünk a véráram-fertőzött betegek monitorozásával, hogy eredményeinket összevethessük a nemzetközi szakirodalomban fellelhetőekkel. Az izolátumok morfológiai módszerekkel történő identifikálási eredményeit összehasonlítottuk a MALDI-TOF készülékkel kapott eredményekkel. A felnőtt intenzív osztályokon fekvő betegek esetében a különböző testtájokról származó izolátumokat molekuláris genetikai módszerrel (pulzáltatott mezejű gélelektroforézis /PFGE/) tipizáltuk. Célunknak tekintettük a rutin mikológiai diagnosztikánk során alkalmazott módszerek optimalizálását, revidálását.

Az általunk kapott epidemiológiai adatok megerősítették a *C. albicans* kiemelkedő szerepét a vizsgált betegcsoportban: a hemokultúra izolátumokban legnagyobb számban ez a faj fordult elő. Második leggyakoribb speciesként szerepelt a *C. glabrata* és a *C. tropicalis*, a harmadik helyen pedig a *C. parapsilosis* áll.

A MALDI-TOF készülékkel végzett munkánk során a teljes extrakciós módszert alkalmaztuk, mely hatékonynak bizonyult a fajszerű identifikálásban: csupán az esetek 6%-ban nem kaptunk eredményt. A MALDI-TOF kedvező lehetőségeket rejt magában, azonban fejlesztéseket igényel, hiszen jelenleg még nem alkalmas arra, hogy felváltsa a rutin mikrobiológiai diagnosztikában a morfológiai, valamint a biokémiai vizsgálatok alapján történő identifikálási módszereket.

PFGE-vel 4 beteg mintáiból származó kromoszómális DNS alapján a törzsek tipizálását tudtuk elvégezni. *C. albicans* esetén azt tapasztaltuk a megvizsgált betegeknél a különböző testtájokról származó izolátumok alapján, hogy az exogén forrásból származó fertőzés lehetősége kizárhatónak tekinthető, a *C. glabrata*-t tartalmazó izolátumok esetében azonban exogén fertőzés meglétét feltételeztük.

Irodalomjegyzék

1. Az Orvosi mikrobiológiai Szakmai Kollégium: Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja a véráram-infekciók mikrobiológiai diagnosztikájára. 2008; 1-10.
2. Cortés, J. A., Reyes P., Gómez C., Buitrago G., Leal, A., L.: Fungal bloodstream infections in tertiary care hospitals in Colombia. *Revista Iberoamericana de Micología*, 2011; **28**(2): 74-78
3. Jakucs, E. : A mikológia alapjai. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, Magyarország, 1999; 197-209
4. Szalka, A., Simon, Gy. : Az orvosi mikológia gyakorlati kérdései. Golden Book Kiadó, Budapest, Magyarország, 2000; 38.
5. Nász, I.: Klinikai mikrobiológia, Medicina, Budapest, Magyarország, 1998; 377.
6. Monoki, M.: Eszközhasználattal összefüggő infekciók belgyógyászati profilú intenzívterápiás osztályon – prospektív epidemiológiai vizsgálat, SZTE ÁOK, 2010; 2-11.
7. Szalka, A., Simon, Gy. : Az orvosi mikológia gyakorlati kérdései. Golden Book Kiadó, Budapest, Magyarország, 2000; 39.
8. Alföldy, Z., Nász, I.: Mikrobiológia gyógyszerész és fogorvostan-hallgatók részére, Medicina, Budapest, Magyarország, 1978; 274
9. Szalka, A., Simon, Gy. : Az orvosi mikológia gyakorlati kérdései. Golden Book Kiadó, Budapest, Magyarország, 2000; 131-175.
10. Kwon-Chung, K. J., Bennett J. E.: Medical mycology. Lea & Febiger, Philadelphia, London, 1992; 770-771.
11. de Hoog, G. S., Guarro, J., Gené, J., Figueras, M. J.: Atlas of clinical fungi. Second edition, Utrecht, Netherlands, 2000 ; 125-236.
12. Nász, I.: Klinikai mikrobiológia, Medicina, Budapest, Magyarország, 1998; 382-385.
13. Szalka, A., Simon, Gy. : Az orvosi mikológia gyakorlati kérdései. Golden Book Kiadó, Budapest, Magyarország, 2000; 182.
14. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Antifungal Agents, Breakpoint Tables for interpretation of MICs, Version 6.1, valid from 2013-03 11

15. Szalka, A., Simon, Gy. : Az orvosi mikológia gyakorlati kérdései. Golden Book Kiadó, Budapest, Magyarország, 2000; 45-72.
16. Nász, I.: Klinikai mikrobiológia, Medicina, Budapest, Magyarország, 1998; 381.
17. Gergely, L.: Orvosi mikrobiológia, Alliter Kiadó és Oktatásfejlesztő Alapítvány, Budapest, Magyarország, 2003; 497-503.
18. Walsh, T. J., Francesconi, A., Kasai, M., Chanock, S. J.: PCR and Single-Strand Conformational Polymorphism for Recognition of Medically Important Opportunistic Fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995; **33**: 3216-3220.
19. Hankovszky, P.: Speciális diagnosztikai protokoll - a Candida infekciók diagnosztikája, SZTE Sz-GyAKK, 2014; 1-12.
20. Szalka, A., Simon, Gy. : Az orvosi mikológia gyakorlati kérdései. Golden Book Kiadó, Budapest, Magyarország, 2000; 76-78.
21. Ádám, É., Béládi, I., Gergely, L., Kétyi, I., Nász, I., Pusztai, R., Szabó, B.: Orvosi mikrobiológia. Semmelweis Kiadó, Budapest, Magyarország 1998; 287-288.
22. Dóczi, I., Pető, Z., Fodor, E., Bereczki, L., Nagy, E., Hajdú, E.: Evaluation of fungaemia infections in a Hungarian University hospital between 1996 and 2009, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2012; **59**: 29-41.
23. <http://www.klinikaikozpont.uszeged.hu/clinmicro/hu/betegellatas/rutinmikrobiologiai-diagnosztika.html>
24. http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/hu/56513_880050_HU.pdf
25. Etest technical guide No. 4: Antifungal susceptibility testing of yeasts. Solna, Sweden, AB biodisk
26. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. Second edition. Wayne, PA, NCCLS. 2002
27. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Antifungal Agents, Breakpoint Tables for interpretation of MICs, Version 6.1, valid from 2013-03 11
28. Bruker Daltonik GmbH, *Microflex LT MALDI-TOF MS Instruction Manual*, 2011
29. Bruker Daltonik GmbH, *MALDI Biotyper 3.0 User Manual Revision 2*, 2011
30. Platelia Aspergillus EIA 62794 (BIO-RAD) (2011)
31. McCluskey, K., Russel, B.W., Mills, D.: Electrophoretic karyotyping without the need for generating protoplasts. *Current Genetics*, 1990; **18**: 385-386.
32. Fodor, E., Dósa, E., Nagy, Á., Nagy, E., Ferenczy, L.: Karyotyping of *Candida albicans* and *Candida glabrata* isolates from recurrent vaginal infections by pulsed-

- field gel electrophoresis. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2002; **49**: 59-68.
33. McCluskey, K., Russel, B.W., Mills, D.: Electrophoretic karyotyping without the need for generating protoplasts. *Current Genetics*, 1990; **18**: 385-386.
 34. Dóczi, I., Pető, Z., Fodor, E., Bereczki, L., Nagy, E., Hajdú, E.: Evaluation of fungaemia infections in a Hungarian University hospital between 1996 and 2009, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2012; **59**: 29-41.
 35. S. J. Taj-Aldeen, S., J., Kolečka, A., Boesten, R., Alolaqi, A., Almaslamani, M., Chandra, P., Meis, J., F., Boekhout, T.: . Epidemiology of candidemia in Qatar, the Middle East: performance of MALDI-TOF MS for the identification of *Candida* species, species distribution, outcome, and susceptibility pattern. *Infection*, 2014; **42**: 393-404.
 36. Yapar, N.: Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2014; **10**:95-105.
 37. Vrioni, G., Matsiota-Bernard, P.: Molecular Typing of *Candida* Isolates from Patients Hospitalized in an Intensive Care Unit. *Journal of Infection*, 2001; **42**: 50-56.
 38. Hamal, P., Kappe, R., Rimek, D.: Rate of transmission and endogenous origin of *Candida albicans* and *Candida glabrata* on adult intensive care units studied by pulsed field gel electrophoresis. *Journal of Hospital Infection*, 2001; **49**: 37-42.
 39. Abdeljelil, J., B., Saghrouni, F., Khammari, I., Gheith, S., Fathallah, A., Said, M., B., Boukadida, J. : Investigation of a Cluster of *Candida albicans* Invasive Candidiasis in a Neonatal Intensive Care Unit by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Scientific World Journal* 2012; Article ID 138989, 7 pages.
 40. Fodor, E., Dósa, E., Nagy, Á., Nagy, E., Ferenczy, L.: Karyotyping of *Candida albicans* and *Candida glabrata* isolates from recurrent vaginal infections by pulsed-field gel electrophoresis. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2002; **49**: 59-68
 41. Abdeljelil, J., B., Saghrouni, F., Khammari, I., Gheith, S., Fathallah, A., Said, M., B., Boukadida, J. : Investigation of a Cluster of *Candida albicans* Invasive Candidiasis in a Neonatal Intensive Care Unit by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Scientific World Journal* , 2012; Article ID 138989, 7 pages.

42. Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., Schubert, S.: MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics- identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012; **93**: 965-974.
43. Kurtzman, C.,P.: Recognition of Yeast Species from Gene Sequence Comparisons. *The Open Applied Informatics Journal*, 2011; **5**: 20-29.
44. Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., Schubert, S.: MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics- identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012; **93**: 965-974.
45. Pulcrano, G., Iula, D., V., Vollaro, A., Tucci, A., Cerullo, M., Esposito, M., Rossano, F., Catania, M., R.: Rapid and reliable MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Candida non-albicans* isolates from bloodstream infections. *Journal of Microbiological Methods*, 2013; **94**: 262-266.
46. Leli, C., Cenci, E., Cardaccia, A., Moretti, A., D'Aló, F., Pagliochini, R., Barcaccia, M., Farinelli, S., Vento, S., Bistoni, F., Mencacci, A.: Rapid identification of bacterial and fungal pathogens from positive blood cultures by MALDI-TOF MS. *International Journal of Medical Microbiology*, 2013; **303**: 205-209.
47. Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., Schubert, S.: MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics- identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012; **93**: 965-974.

Köszönetnyilvánítás

Munkám nem jöhetett volna létre témavezetőm, Csányiné Dr. Dóczi Ilona segítségével, aki tudásával és szakmai tapasztalataival irányította, segítette munkámat. Szeretném megköszönni Zsoldiné Dr. habil. Urbán Editnek, a Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet vezetőjének a lehetőséget, hogy intézetében tudományos munkát végezhettem. Köszönettel tartozom Dr. Sóki Józsefnek a PFGE kivitelezésében nyújtott segítségéért, és Bereczki Lászlónak a MALDI-TOF méréseknél nyújtott segítségéért, valamint az SZTE Sz-GyAKK Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet Parazitológia-Szerológia-Mikológia Részleg dolgozóinak.

Köszönettel tartozom Dr. Pfeiffer Ilonának, hogy belső konzulensként értékes segítséget nyújtott a PFGE kivitelezésében.

Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott Venkei Annamária a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a

- teljes extrakciós módszert
- MALDI-TOF MS méréseket
- intakt kromoszómális DNS preparációját
- protoplasztok készítését
- PFGE-t
- epidemiológiai adatok gyűjtését
- törzsek átoltását

végeztem el.

Venkei Annamária

Szeged, 2014. június 20.