

Humán patogén gombák: identifikálási sémák kifejlesztése, kimutatásukra molekuláris genetikai módszerek alkalmazása és érzékenységük értékelése

Ph.D. tézis

Dóczy Ilona

Egyes becslések szerint körülbelül 200 olyan gombafaj ismert, melyek humán fertőzéseket okoznak. Az általuk okozott kórképek igen változatosak: lehetnek felületi fertőzések (pl.: körmök, bőr gombás fertőzései), azonban kialakulhatnak mélyebb (belső szerveket, keringési szervrendszert érintő), sokszor fatális kimenetelű invazív infekciók is. Morfológiailag a humán patogén gombákat három csoportba soroljuk: sarjadzó, fonalas és dimorf gombák.

Az élesztők közé olyan gombák tartoznak, melyek sarjadzással képesek ivartalan módon szaporodni. Mikro- és makromorfológiai sajátosságai nagy mértékben segítik fajszerű azonosításukat. Ezen csoport tagjai például a *Candida*-, *Cryptococcus*-, *Geotrichum*-, *Malassezia*-, *Rhodotorula*-, *Saccharomyces*- és *Trichosporon*-fajok. A *Candida* speciesek az emberi normál flóra tagjaiként a gastrointestinalis és az urogenitalis traktus nyálkahártyáin valamint a bőr felszínén fordulnak elő. Különböző hajlamosító tényezők (pl.: szélesspektrumú antibiotikumok alkalmazása, immunszuppresszió, -deficiencia, emelkedett extracelluláris glükózkoncentráció) hatására azonban opportunista mikózisokat okozhatnak. A biofilmképzés mint patogénitási faktor az antifungális terápia sikertelenségéhez vezethet.

A fonalas gombák valódi gombafonalakat (hypha) képeznek, melynek sejtjei között fiziológiai kapcsolat van. Mikro- és makroszkópikus tulajdonságaik alapján gyakran már fajszerűen identifikálhatók. Környezetünkben mindenütt előfordulnak: a levegőben és a talajban, valamint az ezekkel érintkező tárgyakon is találkozunk spóráikkal. Immunkompetens egyének esetében gyakran csak kolonizálnak (főként a felső légutakban, bőr felszínén), azonban immunszuppresszió, illetve bizonyos hajlamosító tényezők hatására akár fatális kimenetelű invazív infekciókat okozhatnak. Ebben virulenciafaktoraik (pl.: toxinok, proteázok termelése, kóplement-gátlás, növekedés 37 °C-on) is fontos szerepet játszanak. Orvosi szempontból jelentős genusok például: *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Microsporum* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Scedosporium* spp., *Trichophyton* spp.

A dimorf gombák közé olyan fajok tartoznak (*Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*), melyek 37 °C-on élesztő formában, 25 °C-on pedig fonalas gombaként nőnek. Földrajzilag jól körülhatárolt területeken fordulnak elő.

A gombák okozta infekciók kezelésére számos antifungális szer áll rendelkezésre. Leggyakrabban alkalmazottak az azolok (fluconazol, itraconazol, ketoconazol, voriconazol) és a poliének (amphotericin B, nystatin). Invazív infekciók esetében fontos az izolátumok antimikotikumokkal szembeni érzékenységének tesztelése, mely számos módszerrel (pl.: agar-, leveshígításos, korongdiffúziós módszer, Etest) kivitelezhető.

Munkánk egyik célja olyan identifikálási sémák kidolgozása volt, mellyel a rutin mikrobiológiai laboratóriumi diagnosztikában fajsinten könnyen azonosíthatók a humán mintákból izolálható sarjadzó gombák hagyományos módszerekkel. A Sabouraud chloramphenicol agaron (SAB) nőtt telepek makromorfológiája (színe, alakja, illata, állaga) a kiinduló pontja az azonosítási folyamatnak. A sima felszínű, fehér vagy krémszínű, vajszerű telepeket képező fajok közül a humán mintákból leggyakrabban izolált *C. albicans* már csíratömlő-képzése alapján 2-2.5 óra elteltével identifikálható, habár néhány esetben a *C. tropicalis* is képezheti. Ez utóbbi fajnál azonban nagyobb a sarjadzó sejtek mennyisége mint a csíratömlő-pozitív sejteké. A vizsgálat eredményének kornfirmálása CHROMagar Candida, valamint a rizsagaron látható mikromorfológia alapján lehetséges. Ezek alkalmazásával azonosítható még a *C. glabrata*, a *C. inconspicua*, a *M. pachydermatis* és a *S. cerevisiae* is. További fajok identifikálása céljából biokémiai tesztek (urea-, eszkulin-hidrolízis, nitrát-redukció, cellobióz, galaktóz, laktóz, maltóz, melibióz, N-acetil-D-glükózamin, raffinóz asszimilációja, etanol, cycloheximid tolerancia) is alkalmazunk. Így nagy biztonsággal azonosítható a *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. haemulonii*, *C. intermedia*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. pulcherrima*, *C. rugosa*, *C. utilis*, *C. viswanathii*. Ez segít a *Cryptococcus*-fajok (*C. albidus*, *C. ater*, *C. curvatus*, *C. humicola*, *C. laurentii*, *C. uniguttulatus*) identifikálásában is kiegészítve a napraforgómagot tartalmazó „*Cryptococcus neoformans* agar”-ral, melyen a névadó faj barna színű telepeket képez.

A SAB táptalajon száraz, lapos, gyűrött vagy hasadt szélű telepeket képező fajok azonosításakor szintén a fentiekben említett módszereket (kiv.: csíratömlőképzés) alkalmazzuk, csak alkalmazásuk sorrendjében van eltérés a sima telepekhez képest. Megtaláljuk közöttük a *C. tropicalis*-t és a *C. inconspicua*-t is, de így identifikálható a *C. catenulata*, *C. chiropterorum*, *C. ciferrii*, *C. humicola*, *C. krusei*, *C. lambica*, *C. lipolytica*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *C. viswanathii*, *C. zeylanoides*. A 42 °C-on történő inkubálás segít a *C. krusei* és a *C. lipolytica*, elkülönítésében, hiszen az utóbbi faj nem nő ezen hőmérsékleten. Az arthrospórát képező *Geotrichum*- és *Trichosporon*-fajok morfológiai alapú elkülönítését xilóz, cellobióz, illetve arabinóz és inozitol asszimilációjának vizsgálatával kiegészítve

lehetővé válik a *G. candidum*, *G. capitatum*, *G. clavatum*, valamint a *T. asahii*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides* és a *T. ovoides* fajszerűtű azonosítása.

A lipofil *Malassezia*-fajokat (*M. furfur*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*) 40 °C-on Leeming & Notman agaron, Cremophore EL-lel kiegészített SAB agaron történő növekedés, mikromorfológia, valamint kataláz-próba és eszkulin-hidrolízis eredményeik alapján identifikáljuk.

SAB táptalajon vörös, lazacszínű vagy narancssárga telepeket képeznek a *Rhodotorula*-fajok (*R. glutinis*, *R. minuta*, *R. mucilaginosa*), a *Sporobolomyces salmonicolor* és a *C. macerans*. Ezen fajok közül csak a *S. salmonicolor* képez ballisztokonídiumokat, így már mikromorfológiai vizsgálat alapján elkülöníthető. Nitrát-redukció, 30 °C-on SAB táptalajon történő növekedés és a raffinóz asszimilációja alapján már pontosan identifikálható a többi faj is.

Laboratóriumunk 1999 óta vesz részt a globális, Pfizer által támogatott ARTEMIS Antifungal Surveillance Study-ban. Ennek keretében 2003 és 2005 között 7089 *Candida* spp. törzs fluconazzal és voriconazzal szembeni érzékenységét teszteltük korongdiffúziós módszerrel a BIOMIC rendszer segítségével. A vizsgált időszakban a két leggyakrabban izolált faj a *C. albicans* (az összes izolátum 80%-a) és a *C. glabrata* (9%) volt. 2003-ban 99 *C. krusei* és 61 *C. tropicalis* törzset teszteltünk, melyeknek egymáshoz viszonyított aránya csökkent 2004-ben, majd 2005-ben a *C. tropicalis* javára nőtt. A vizsgált időszakban a *C. albicans* izolátumok 99%-a és a *C. glabrata* izolátumok 45-84%-a volt fluconazol-érzékeny. A fluconazol-érzékeny *C. tropicalis*-ok aránya 2003 óta csökkent 10%-kal a három év alatt. A voriconazol hatékonyságát a 2003-ban kapott MIC50- és MIC90-értékek alapján jellemeztük. Ezek az értékek az ismert fluconazol-érzékeny fajok (*C. albicans*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*) esetében alacsonyabbak voltak mint a fluconazol-rezisztens fajok (*C. glabrata*, *C. inconspicua*, *C. krusei*) esetében. A voriconazol fluconazolnál nagyobb antifungális hatékonyságáról nemzetközi publikációk számolnak be. A *C. tropicalis* voriconazol MIC-értékei azonban a fluconazol-rezisztens fajokra kapott voriconazol MIC-értékekhez voltak hasonlóak vizsgálataink alapján.

1996 és 2005 között nyomon követtük a *Candida*-fajok okozta vérpálya-fertőzések epidemiológiáját a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának klinikáin. A 10 éves időintervallum során 133 candidaemia esetet regisztráltunk. A leggyakrabban izolált faj a *C. albicans* volt. 2005-ben a *C. albicans* és *C. glabrata* által okozott epizódok száma azonos volt egy, 12 beteget érintő *C. glabrata*-okozta járvány miatt. 287 izolátum antifungális szerekekkel (fluconazol, itraconazol, ketoconazol, amphotericin B) szembeni

érzékenységét vizsgáltuk. A fluconazol-rezisztencia a *C. albicans* törzsek esetében 4%-nak bizonyult, mely magasabb a nemzetközi irodalomban közölt spanyol, izraeli és amerikai adatoknál. Azokkal szembeni keresztrezisztenciát egy esetben detektáltunk, melyben *C. glabrata* volt a kórokozó. Az itraconazzal szembeni rezisztencia (14%) az összes izolátumot tekintve kétszerese volt a fluconazzal szembeni rezisztenciának (7%). Minden tesztelt törzs érzékenynek bizonyult amphotericin B-vel, és egy *C. glabrata* kivételével ketoconazzal szemben.

A gombák okozta vérpálya-fertőzések korai diagnosztikája céljából valós idejű PCR módszert fejlesztettünk ki. 22 beteg 54 EDTA-s vérmintáját vizsgáltuk meg általános, gomba-specifikus primerek (ITS1, ITS3, ITS4, ITS86) segítségével. Olyan betegeket vontunk be a study-ba, akik immunszupprimáltak voltak, és/vagy klinikai tüneteik alapján gomba okozta vérpálya-infekció vagy sepsis gyanúja merült fel. PCR és haemocultura tenyésztési eredményeik alapján a betegeket 4 csoportba soroltuk. Az 1. csoportba 13 beteg tartozott, akiknek vérmintáiból egyik módszerrel sem kaptunk pozitív eredményt. A mortalitás ebben a csoportban 38%-os volt. A 14-es számú beteg egy 12 éves politraumatizált lány, akinek haemoculturájából sarjadzó gomba tenyésztett. Azonban a haemocultura-mintavétellel azonos napon vett EDTA-s vérből nem sikerült a gomba DNS-t kimutatni PCR-rel. Ennek oka az egyes vizsgálatokhoz vett vér mennyiségi különbségében keresendő. A tenyésztési eredmény alapján a beteg antifungális szerrel történő kezelése sikerrel zárult. A 3. csoport 3 betege közül kettőnél sikerült utólag PCR-rel igazolni a tenyésztéssel kapott pozitivitást, mivel az EDTA-s vérmintát csak a tenyésztés gomba-pozitivitásának ismeretében küldték. A harmadik beteg esetében azonban molekuláris genetikai módszerrel hamarabb kaptunk pozitív eredményt, habár a beteg adekvát kezelése csak a haemocultura-pozitivitás ismeretében kezdődött el. A PCR-metodika igazi előnye a 4. betegcsoport (5 fő) esetében mutatkozott meg. Minden betegnek volt PCR-pozitív mintája haemocultura-pozitivitás nélkül. Mindegyikük kapott gombaellenes kezelést. A mortalitási arány 1/5 volt ebben a csoportban.

Fonelas gombák humán infekciókban betöltött jelentőségének vizsgálata során Magyarországról elsőként publikáltunk egy *Fusarium verticillioides*-okozta keratitis esetet. A 47 éves betegnél több hajlamosító tényező játszott szerepet a fertőzés kialakulásában: cornea-sérülés, kezeletlen diabetes mellitus, antibakteriális terápia. Cornea-transzplantációt, antifungális kezelést, valamint inzulin-terápia beindítását követően a beteg visusa 0.9. Klinikai mintákból izolált *Trichoderma*-fajok ökofiziológiai tulajdonságait vizsgálva megállapítottuk, hogy minden törzs képes nőni 37 °C-on, mely az általuk okozott opportunistá fertőzések kialakulásában döntő jelentőségű.

2000 és 2002 között 50, humán és környezeti mintákból származó fonalas gomba izolátum (*Acremonium* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp., *Penicillium* spp., *Scopulariopsis* spp., *Trichoderma* spp.) antifungális szerekkel szembeni érzékenységét vizsgáltuk meg különböző módszerekkel. Etest-tel a törzsek 92%-a volt rezisztens fluconazolra MIC > 256 µg/ml-es értékkel. Az itraconazol, ketoconazol és az amphotericin B hatékonyabbnak bizonyult. A legtöbb izolátum esetében nem tapasztaltunk jelentős MIC-értékbeli eltérést sűrűbb kiindulási gombaszuszpenzió alkalmazásakor, mely a lassan növényő fajoknál 1 nappal korábbi leolvasást tett lehetővé. 10 *Trichoderma*-törzs esetében összehasonlítottuk az Etest-tel és az agarhígításos módszerrel kapott eredményeket az irodalomban közölt levehígításos módszer eredményeivel. Ez alapján megállapítottuk, hogy nem volt jelentős különbség a fluconazol MIC-értékekben az első két, említett módszer alapján, azonban – a levehígításos módszerrel összehasonlítva – 1 vagy 2 felezőhígítási lépésnek megfelelő eltérés mutatkozott. Amphotericin B esetében hasonló mértékben voltak magasabbak az agarhígításos módszerrel kapott MIC-értékek.