

A molekuláris diagnosztika lehetőségei onkohematológiai betegek invazív gombainfekcióinak ellátásában

Zajta Erik dr.¹  ▪ Peskó Gergely dr.² ▪ Knapp G. Dániel dr.³
Vad Eszter dr.⁴ ▪ Bödör Csaba dr.¹ ▪ Sinkó János dr.⁵

¹Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Molekuláris Diagnosztikai Labor, Budapest

²Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Belgyógyászati és Hematológiai Klinika, Budapest

³ELTE Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológiai Intézet, Növény szerkezettani Tanszék, Budapest

⁴Dél-pesti Centrumkórház – Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet, Mikrobiológiai Profil, Központi Laboratórium, Budapest

⁵Dél-pesti Centrumkórház – Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet, Hematológiai és Óssejt-transzplantációs Osztály, Budapest

Az onkohematológiai kórképekben szenvedő betegeket nagymértékben veszélyeztetik az invazív gombafertőzések. A leggyakrabban candidiasis, aspergillosis, mucormycosis, cryptococcosis, valamint *Pneumocystis*-pneumonia fordul elő. Az invazív mycosisok diagnosztikáját támogató többféle módszer (tenyésztés, szövettan, szerológia, képalkotó eljárások) ellenére kimutatásuk gyakran kihívást jelent. A gyors technológiai fejlődés következtében a molekuláris biológiai módszereket ma már rutinszerűen alkalmazzák a baktérium- és vírusdiagnosztikában is. Ugyanakkor a molekuláris vizsgálatok hatékonyan segíthetik a mycosisok felismerését is, így számos nemzetközi orvosi irányelv tartalmaz ilyen irányú ajánlásokat. Bár a molekuláris gombavizsgálatok némelyike már megjelent a hazai egészségügyi ellátásban, széles körű elterjedésük nem történt meg. Összefoglaló közleményünkben bemutatjuk a gombák által okozott invazív infekciók molekuláris diagnosztikai eszköztárát. Kitérünk a különböző taxonspecifikus polimeráz-lánreakciókra (PCR), valamint a szekvenálási eljárásokra (Sanger-szekvenálás, újgenerációs szekvenálás), továbbá a gombák azonosítása, illetve az antifungális rezisztencia kimutatása terén betöltött szerepükre. Röviden ismertetjük a Dél-pesti Centrumkórház – Országos Hematológiai és Infektológiai Intézetben és a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében elérhető vizsgálatokat, végül két esetismertetésen keresztül mutatjuk be a módszerek gyakorlati alkalmazhatóságát. A jelen áttekintés hozzájárulást kíván nyújtani a molekuláris gombadiagnosztikai módszerek magyarországi orvosi ellátásban történő nagyobb mértékű implementációjához. *Orv Hetil.* 2025; 166(10): 363–376.

Kulcsszavak: invazív gombafertőzés, mycosis, onkohematológia, molekuláris diagnosztika, DNS-vonalkód

Opportunities offered by molecular diagnostics in the management of invasive fungal infections of oncohematological patients

Invasive fungal infections pose a particular threat to oncohematological patients. Candidiasis, aspergillosis, mucormycosis, cryptococcosis and *Pneumocystis* pneumonia are the most common manifestations. Despite various available approaches (culture, histology, serology, imaging), diagnosis of invasive mycoses is challenging. Owing to rapid technological advancements, molecular biological methods are routinely used in diagnostics of bacterial and viral infections. At the same time, molecular tests can be of substantial assistance in the detection and characterization of mycoses, therefore several international guidelines contain recommendations on them. Although some molecular fungal tests have been introduced in Hungarian healthcare, their widespread application is lagging. Here, we provide a review of molecular tools for clinical fungal diagnostics focusing on taxon-specific polymerase chain reaction (PCR), sequencing techniques (Sanger sequencing, next-generation sequencing) and their roles in identification of fungal pathogens and detection of resistance to antifungal medication. Tests available in South-Pest Central Hospital – National Institute of Hematology and Infectious Diseases and at the Department of Pathology and Experimental Can-

cer Research of Semmelweis University are briefly discussed. Finally, the utility of molecular fungal diagnostics is demonstrated through two case reports. This article aims to contribute to larger implementation of molecular tools in fungal diagnostics in the Hungarian healthcare system.

Keywords: invasive fungal infection, mycosis, oncohematology, molecular diagnostics, DNA barcoding

Zajta E, Peskó G, Knapp G. D, Vad E, Bödör Cs, Sinkó J. [Opportunities offered by molecular diagnostics in the management of invasive fungal infections of oncohematological patients]. *Orv Hetil.* 2025; 166(10): 363–376.

(Beérkezett: 2024. december 9.; elfogadva: 2025. január 6.)

Rövidítések

CI = (confidence interval) megbízhatósági tartomány; Ct = (threshold cycle) küszöbciklus; CT = (computed tomography) komputertomográfia; DNS = dezoxiribonukleinsav; EAPCRI = European *Aspergillus* PCR Initiative; ECOMM = European Confederation of Medical Mycology; EORTC/MSGERC = European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoeses Study Group Education and Research Consortium; ERS = European Respiratory Society; ESCMID = European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases; ESICM = European Society of Intensive Care Medicine; FDA = (U.S. Food and Drug Administration) az Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer-biztonsági és Gyógyszerészeti Hivatala; FPCRI = Fungal PCR Initiative; ISHAM = International Society for Human and Animal Mycology; ITS = internal transcribed spacer; IVD = *in vitro* diagnosztikum; LSU = (large subunit) a 28S riboszomális alegység RNS-ét kódoló DNS-szakasz; MALDI-TOF = (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight) mátrixasszisztált lézer deszorpció/ionizációs-repülési idő mérésén alapuló; PCR = (polymerase chain reaction) polimeráz-láncreakció; qPCR = (quantitative PCR) kvantitatív PCR; rDNS = riboszomális RNS-t kódoló DNS; SARS-CoV-2 = (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) súlyos akut légúti tünetegyüttest okozó koronavírus-2; SSU = (small subunit) a 18S riboszomális alegység RNS-ét kódoló DNS szakasz; TEF1 α = (translation elongation factor 1 α) translációs elongációs faktor-1 α

Az invazív mycosisokról általában

Az invazív (szisztémás, mély) mycosisok gombák által okozott súlyos, nagy halálozási aránnyal járó fertőzések, amelyek gyakran valamely hajlamosító tényező (hematológiai malignitás, szerv- vagy összejtájtöltetés vagy más eredetű strukturális tüdőkárosodás) talaján alakulnak ki. A kórképek megjelenése a kórokozó típusának, a gazdaszervezet tulajdonságainak, immunstatusának és az infekció kiterjedtségének függvényében eltérő. A kórfolyamat egyik jellemző formája, amikor a – rendszerint a sarjadzógombák körébe tartozó – kórokozó kezdetben kolonizálja az emberi szervezetet, majd bizonyos feltételek fennállása esetén a felszínekről a szövetekbe és a véráramba terjedve okoz kiterjedt szervkárosodást, illetve szepszist. A fertőződés egy másik, gyakori módja főként fonalagombák és ún. endémiás dimorf gombák (például *Histoplasma*) esetében figyelhető meg: a levegőben talál-

ható spórák belégzését követően azok az alsó vagy felső légutakba jutnak, és főként a károsodott immunstatusú emberekben invazív válnak. Ilyenkor a nyálkahártya, a környező szövetek, illetve a tüdő erei mentén növekedve elhalásokat okoznak, majd a kezdetben döntően légúti megbetegedés távolabbi szervekben, másodlagos gócot okozva, szétterjedhet a szervezetben. Becslések szerint az invazív gombafertőzések évente globálisan mintegy 6,5 millió személyt érhetnek [1].

A kórképek prognózisa egyaránt függ a kórokozótól, a gazdaszervezet immunválaszkészségétől, a felfedezés időpontjától és az alkalmazott terápiától. Az akut infekciók halálozása kezeletlen esetekben 90–100%, de megfelelő kezelés mellett is elérheti a 30–50%-ot [1].

Az invazív mycosisok diagnosztikájának időben történő megállapítása jelentős kihívást jelent. Nincs olyan – minden gombainfekció kimutatására alkalmas – módszer vagy eszköz, amely a korai, specifikus diagnosztika céljára önmagában alkalmas lenne. Mindezek folytán, főként a gombaellenes szerekekkel végzett klinikai vizsgálatok szempontjainak egységesítése céljából alkották meg az invazív gombafertőzések definíciórendszerét [2–6]. Bár ezek elsősorban tudományos célokat szolgáltattak, jelentős hatást gyakoroltak a klinikai diagnosztika mindennapos gyakorlatára is.

Jóllehet a különféle betegcsoportokra kifejlesztett definíciók logikája részben eltérő, néhány alapvető szempont valamennyi algoritmusban megtalálható:

- A kórkép fennállását teljes bizonyossággal csak akkor állapíthatjuk meg, ha kórokozó gomba az érintett szövetből (vagy vérből) mutatható ki. Meg kell ugyanakkor jegyezni, hogy a szövetminta fénymikroszkópos képe a gomba jelenlétét bizonyítja ugyan, ám annak egyértelmű rendszertani besorolása gyakran csak mikrobiológiai vizsgálatokkal lehetséges.
- Ha szöveti minta elemzésére nincs mód, az infekció diagnosztika csak valószínűségi alapon állapítható meg. Az itt használható szempontok az alábbiak:
 - Az invazív mycosisok kialakulásának előfeltétele egy vagy több kockázati tényező (például neutropenia, szteroidterápia, T-sejt-hiány) megléte.
 - Igazolni kell a betegség klinikai jelenlétét (például CT-vizsgálattal kimutatható jellemző tüdőelváltozás vagy antibiotikumra nem reagáló szepszis).

- Mindezt meg kell erősíteni mikrobiológiai (mikológiai) módszerekkel (például releváns mintából kitenyészhető kórokozó vagy ezekből kimutatható gombaantigén jelenléte) is. Ha a mikrobiológiai megerősítés elmarad vagy sikertelen, mindössze az invazív mycosis gyanúját fogalmazhatjuk meg.

Példaként az 1. táblázatban mutatjuk be az invazív fonalasgomba-fertőzések definícióit az EORTC/MSGERC (European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group Education and Research Consortium) munkája alapján.

Invazív gombainfekciók onkohematológiai betegek körében

Az invazív mycosisokra hajlamosító tényezők között kiemelt fontosságúak az onkohematológiai kórképek és az ezek kezelése kapcsán fellépő immunhiányos állapotok. Elsősorban a tartós és mély neutropenia, továbbá a T-lymphocyták csökkent száma, a barriersérülések, az indukciós kemoterápia, az allogén őssejtátültetés és az annak szövődeményeként fellépő graft-versus-host betegség növeli a gombafertőzések kockázatát [5, 7]. A leggyakrabban invazív candidiasis (candidaemia), aspergillosis (felső és alsó légúti, központi idegrendszeri és disszeminált), mucormycosis (felső és alsó légúti, központi idegrendszeri és disszeminált), cryptococcosis (meningitis és pulmonalis), illetve *Pneumocystis*-infekció (interstitialis pneumonia) fordul elő, de egyes rizikócsoportokban ritkábban megfigyelt patogén gombák is felbukkanhatnak.

A felsorolt infekciókkal a hazai hematológiai centrumok szakemberei is rendszeresen szembesülnek [8, 9].

Az egyes kórképek előfordulási gyakoriságáról rendelkezünk publikált nemzetközi és más országokból származó adatokkal [1]. Bár magyar esettanulmányokat rendszeresen közölnek [10, 11], a hazai incidenciát nem ismert pontosan, mivel az invazív gombafertőzések nem tartoznak a kötelezően jelentendő fertőzőes kórképek közé, így csak becslésekre hagyatkozhatunk [12].

Az invazív mycosisok diagnosztikus eszköztárát képalakító vizsgálatok, hisztopatológiai/citológiai vizsgálómódszerek, a mikrobiológia területén pedig mikroszkópos, tenyésztéses, illetve antigének, antitestek, továbbá nukleinsavak kimutatásán alapuló eljárások alkotják. Napjainkra elterjedt a – főként – sarjadzógombák tömegspektrometriás módszerrel történő azonosítása is. Hazánkban a felsorolt metodikák csaknem kivétel nélkül hozzáférhetőek, a helyi diagnosztikus egységekben ugyanakkor különbözhet a rendelkezésre álló technika, illetve a speciális mikológiai szakértelem elérhetősége. A molekuláris gombadiagnosztika területén különösen szembetűnő a fejlesztés szükségessége. Emellett ki kell emelnünk, hogy mind a klinikai, mind a diagnosztikus területeken nagyobb hangsúlyt kapnak a gyakoribb bakteriális infekciók, mint a sokak által egzotikusnak gondolt mycosisok.

A gombainfekciók kezelése nemzetközi irányelvek figyelembevételével történik [13–18]. A protokollokban javasolt valamennyi fontos antifungális készítmény hazánkban is elérhető, így a klinikai eredményeket főként nem ezek beszerezhetősége és alkalmazása, hanem az

1. táblázat | A bizonyított és a valószínű fonalasgomba-betegség definíciói az EORTC/MSGERC (2020) szerint (a molekuláris diagnosztikai vonatkozások aláhúzással kiemelve szerepelnek)

BIZONYÍTOTT FONALASGOMBA-BETEGSÉG				
Steril minta mikroszkópos vizsgálata	Steril minta tenyésztése	Hemokultúra	Szerológia	Szöveti nukleinsav-diagnosztika
Gombaelemek és szövetkárosodás kimutatása a szövettani mintában	Fonalasgomba növekedése a tenyészetben (kivéve BAL, orrmelléküregeg punkttátum, vizelet)	Megfelelő klinikai kép mellett fonalasgomba (például <i>Fusarium</i> spp.) a vérmintában	Nem alkalmazható	<u>Gomba DNS-PCR-rel történő amplifikációja DNS-szekvenálással kombinálva, amennyiben a formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintából készült metszetben fonalasgomba-elemek láthatók</u>
VALÓSZÍNŰ FONALASGOMBA-BETEGSÉG				
Hajlamosító tényezők	Klinikai kép	Mikológiai bizonyíték		
Például neutropenia, hematológiai malignitás, szervtranszplantáció, graft-versus-host betegség, különféle immunszuppresszív és -moduláns terápiák	Az érintett anatómiai régió, illetve szerv jellemző eltérése képalkotó vizsgálatokkal vagy tracheobronchitis-re utaló bronchoszkópos kép	Fonalasgomba kimutatása tenyésztéssel vagy mikroszkópiával. Aspergillosis: galaktománanantigén-pozitivitás (vér, BAL). <u>Aspergillus-PCR (ha az alábbiak közül legalább egy feltétel teljesül): 1) plazmából/szérumból/teljes vérből két vagy több, egymást követő pozitív minta. 2) BAL-minta két alkalommal mérve pozitív. 3) Legalább egy plazmából/szérumból/teljes vérmintából PCR-pozitivitás PLUSZ egy BAL-minta PCR-pozitivitása</u>		

BAL = bronchoalveolaris lavage; DNS = dezoxiribonukleinsav; PCR = polimeráz-láncreakció

időben megállapított diagnózis befolyásolja. Fontos leszögezni, hogy bár vannak széles spektrumú – több gombafaj ellen is hatékony – gombaellenes vegyületek, a legkedvezőbb eredményt ígérő terápia kiválasztásához elengedhetetlen a kórokozó lehető legpontosabb azonosítása. A nagy kockázattal terhelt betegcsoportokban, illetve ahol a diagnosztikus eszközök hozzáférése korlátozott, szóba jön az antifungális szerek profilaktikus vagy empirikus alkalmazása is.

Az onkohematológiai gyakorlatban leggyakrabban előforduló invazív mycosisok legfontosabb jellemzőit a 2. táblázatban foglaljuk össze.

Molekuláris vizsgálati lehetőségek a gombafertőzések diagnosztikájában

A gombainfekciók azonosítását számos módszer segíti. A tünetek, a képalkotó és szerológiai vizsgálatok eredményei önmagukban is iránymutatók lehetnek, azonban a fiziológiásan steril helyről vett szövetminta pozitív tenyésztési eredménye, valamint gombaképletekre nézve pozitív szövettani eredménye igazolja egyértelműen az invazív fertőzés fennállását. A kórokozó gomba minél pontosabb meghatározása hozzájárul az adekvát terápia megválasztásához [19].

A kórokozó gombák tenyésztésalapú klasszikus meghatározása a gombadiagnosztika alapvető eszköze, amely a leggyakrabban morfológiai és biokémiai vizsgálatokra támaszkodik. Ez olykor időigényes folyamat, mivel szubkultúrákra lehet szükség, illetve a karakterisztikus morfológiai képletek kifejlődését is meg kell várni. A lelet-

átfordulási idő így akár több hétre nyúlhat [19–21]. A meghatározást nehezítheti a gombafajok fenotípusos változatossága, a reprodukív képletek kifejlődésének elmaradása, valamint a specializált mikológiai szaktudás szükségessége. A tenyésztés időnként annak ellenére sikertelen, hogy a kiindulási mintában a kórokozó gomba megtalálható. Léteznek nem tenyésztendő kórokozó gombák is (például *Pneumocystis*, *Lacazia*) [22–24]. A tenyésztetek pontos és gyors meghatározásában az utóbbi időben jelentős segítséget nyújt a MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight) tömegspektrometria, amely fajspecifikus fehérje-profilok alapján teszi lehetővé az identifikációt. Ehhez kevesebb specializált mikológiai szaktudás szükséges, és morfológiailag/biokémiaileg kevésbé jellegzetes tenyésztetek esetén is gyorsan megbízható eredményt adhat. A módszer azonban fenotípus-alapú, és nagyban függ az alkalmazott, a leggyakrabban nem nyilvános referenciadatbázisok minőségétől [19, 25, 26].

A bioptátumok kórszövettani vizsgálata során észlelt gombaképletek morfológiája, festődése utalhat a gomba rendszertani besorolására, a nemzetség vagy faji szintű biztos azonosítás azonban gyakran nem lehetséges. Példa erre, hogy szövettani preparátumban az *Aspergillus*-hifák megkülönböztethetetlenek az egyéb opportunistáknak a patogén gombák fonalaitól (például *Fusarium*, *Scedosporium*) [27]. Bár léteznek gombacsoport-specifikus antitestek, amelyek használata elősegítheti a kórokozó gomba nagyobb biztonsággal történő azonosítását [28], ezek használata hazánkban nem terjedt el, illetve a módszerek korlátai miatt az EORTC/MSGERC ajánlása nem java-

2. táblázat | Az onkohematológiai betegekben rendszeresen előforduló invazív mikózisok jellemzői

Kórkép	Kórokozó	Hajlamosító tényezők	Hagyományos diagnosztika	Választandó terápia	Halálozás	
					Megfelelő kezelés nélkül	Kezelt esetekben
Invazív candidiasis, candidaemia	<i>Candida</i> spp. (számos faj, eltérő rezisztencia)	Neutropenia, érpályába ültetett műanyag eszköz (kanül), mucositis	Tenyésztés (hemokultúra), β -D-glükán-antigén	Echinokandin-vegyületek (de: növekvő rezisztencia, multirezisztens fajok)	90%	35%
Invazív aspergillosis	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus</i> spp.	Neutropenia, allogén őssejt-transzplantáció, graft-versus-host betegség	Képalkotó vizsgálat, galaktomannán-antigén (vér, bronchusmosó folyadék)	Vorikonazol, izavukonazol (egyes országokban azolrezisztencia lépett fel), amfotericin B	95%	50%
Invazív mucormycosis	Számos gomba (<i>Mucor</i> spp., <i>Rhizomucor</i> spp., <i>Absidia</i> spp.)	Mint az invazív aspergillosisnál + vastúlterhelés, diabetes mellitus	Képalkotó vizsgálat, szövettani minta	Amfotericin B, izavukonazol, műtét	100%	25% (hematológia/transzplantáció: 50–70%)
Invazív cryptococcosis (meningitis, pulmonalis infekció)	<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Cryptococcus gattii</i>	T-lymphocyták csökkent száma	Antigénkimutatás (liquor, vér), tenyésztés	Amfotericin B, flukonazol	100%	60%
<i>Pneumocystis</i> -infekció (pneumonia)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	T-lymphocyták csökkent száma	Mikroszkópia	Kotrimoxazol	100%	40%

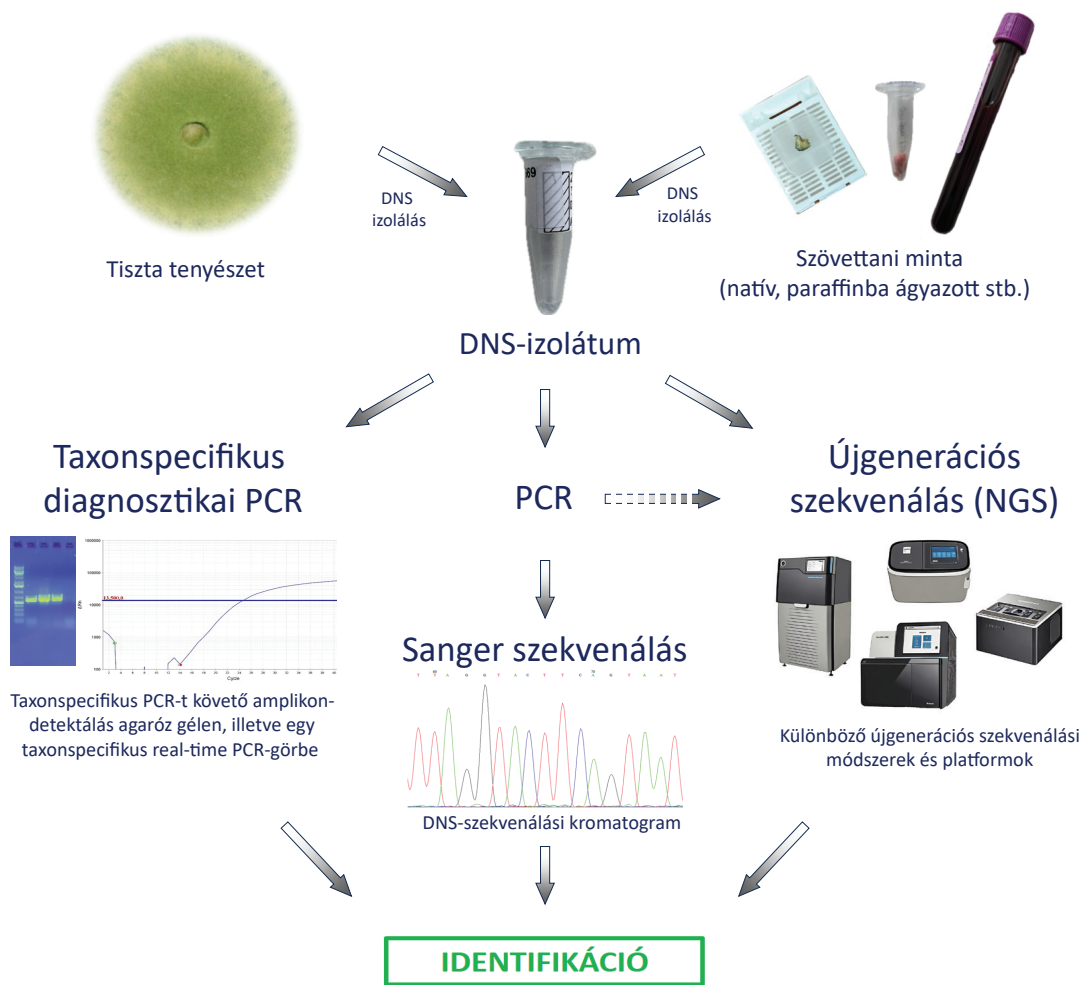
solja a rutindiagnosztikában történő alkalmazásukat [29].

A gombák DNS-e izolálható mind biopsziás anyagból, mind a tenyészetek akár fiatal, fejletlen formájából. Az örökítőanyag vizsgálata egyértelmű meghatározást tehet lehetővé [30, 31]. A DNS felhasználható ún. taxonspecifikus PCR-hez, amely arról ad tájékoztatást, hogy egy adott rendszertani csoportba (taxonba) tartozó organizmus örökítőanyaga az adott mintában jelen van-e. Továbbá az izolált DNS adott szakaszainak bázissorrend-meghatározásával (szekvenálásával) olyan genomi régiókról kaphatunk információt, amelyek pontos azonosítást tesznek lehetővé, esetleg terápiarezisztenciát jelezhetnek [29, 31] (1. ábra). A molekuláris módszerek hozzáadott értéke miatt a modern nemzetközi ajánlások és az invazív gombafertőzések EORTC/MSGERC által kidolgozott konszenzusdefiníciói már beépítették ezek alkalmazását [5, 15, 32]. Megemlítendő, hogy a gombák örökítőanyaga egyéb módszerek (például *in situ* hibridizáció, mágneses rezonancia) segítségével is lehetőséget nyújthat azonosításra [30], ezeket azonban a jelen közleményben nem részletezzük.

Taxonspecifikus PCR

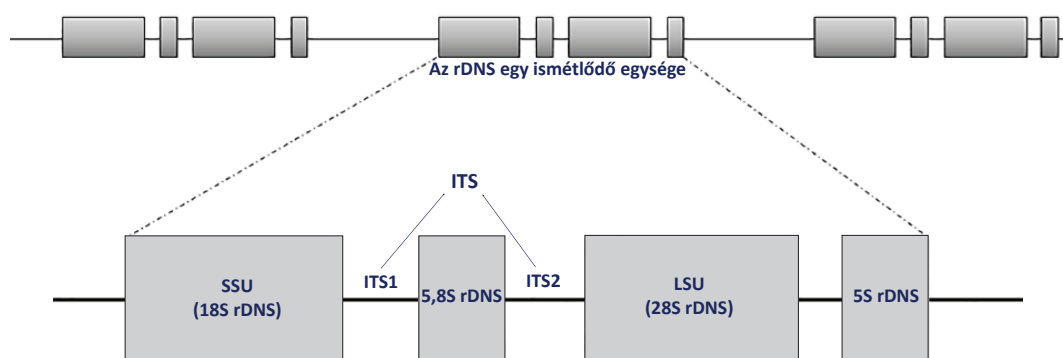
Taxonspecifikus PCR során egy adott élőlénycsoportra jellemző nukleinsavszakasz amplifikálódik. A módszernek több formája ismert, azonban a klinikai diagnosztikában legelterjedtebb kivitelezése a 'real-time' (valós idejű) PCR. Ennek során fluoreszcens jel utal a kimutatni kívánt DNS-szakasz mennyiségére. Jellemző mérőszáma a Ct- (threshold cycle) érték, amely az a ciklusszám, amelynél a fluoreszcencia először ér el egy meghatározott küszöbértéket. Ennek értelmében az alacsonyabb Ct-érték több 'target' (cél) DNS-szakasz jelenlétére utal a mintában [33, 34].

A pántfungális PCR alkalmazása során kizárólag a gombák kimutatására kifejlesztett univerzális primerek használatával nyílik lehetőség gombaeredetű DNS kimutatására klinikai mintából, így ez a technika egyedül a gombák jelenlétére vagy hiányára enged következtetni. Az alkalmazott primerek leggyakrabban a gombák riboszomális génklaszterének (vagy riboszomális DNS, rDNS, 2. ábra) egyes szakaszaihoz kötődnek [35]. A módszer hasznos lehet olyan esetben, amikor nincs ki-



1. ábra

A kórokozó gombák molekuláris azonosításának főbb lehetőségei
 Szaggatott vonal: az újgenerációs szekvenálás egyes típusai PCR nélkül is kivitelezhetők.
 DNS = deoxiribonukleinsav; PCR = polimeráz-lánreakció



2. ábra

A sejtmagi riboszomális DNS vázlatos szerkezete [31]

DNS = dezoxiribonukleinsav; ITS = internal transcribed spacer; LSU = a 28S riboszomális alegység RNS-ét kódoló DNS-szakasz; rDNS = riboszomális RNS-t kódoló DNS; SSU = a 18S riboszomális alegység RNS-ét kódoló DNS-szakasz

fejzett gyanú egy bizonyos gombacsoportra nézve, vagy a fertőzést ritka gomba kórokozó okozza [36]. Fiziológián steril minta esetén (például vér, plazma) a pozitív eredmény invazív gombafertőzésre utalhat. A később tárgyalt PCR-ekhez hasonlóan nem steril minták esetén (például bronchoalveolaris lavage, bőr, sinus) az eredmény interpretációja kevésbé egyértelmű. Ilyenkor ugyanis különösen fontos mintatípusonként meghatározni a háttérzajt és az egészséges emberek mintájából is észlelhető jelek intenzitását, hiszen a gombák természetes kommenzalista jelenléte miatt fertőzést nem mutató szövetekben is számítani lehet gomba-DNS korlátozott mértékű amplifikációjára [31, 37]. Mivel a patológiai egységekben használt paraffinos blokkok (formalinban fixált, paraffinba ágyazott minták) elkészítése nem steril körülmények között történik, ezek a környezetben megtalálható gombaképletekkel érintkezhetnek, így a háttérjel és a kontamináció ismerete ebben az esetben sem hanyagolható el. A környezeti kontamináció lehetősége miatt a formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintákból gombák azonosítása céljából végzett molekuláris vizsgálat kizárólag abban az esetben ajánlott, ha a szövettani vizsgálat előzetesen gombaképleteket igazolt [29, 38]. Ebből adódóan e mintatípus esetén a pánfungális PCR inkább egyfajta előszűrésnek használható további molekuláris vizsgálatok előtt, amely segít megbecsülni, hogy a minta milyen mennyiségben tartalmaz gomba-DNS-t. Tapasztalatunk szerint a pánfungális PCR-rel erősen pozitív mintából nagyobb valószínűséggel kivitelezhető a gomba pontosabb meghatározását célzó Sanger-szekvenálás. Továbbá olyan ritka szövetminta esetén, amelyben a kórszövettani vizsgálat gombára utaló képleteket azonosít, azonban a pánfungális PCR negatív, felvetődhet annak lehetősége, hogy az infekció valójában nem gomba, hanem hasonló morfológiájú egyéb kórokozó (például *Prototheca*, *Pythium*) következménye [39].

Az *Aspergillus*-PCR az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó gombák örökítőanyagát mutatja ki. Elérhetőek olyan tesztek, amelyek ezen túlmenően fajkomplex (például *Aspergillus fumigatus* komplex) szintű meghatározást is

lehetővé tesznek. Az orvosi mikológiában az összes gomba-PCR közül az *Aspergillus*-PCR kapta a legnagyobb figyelmet. A European *Aspergillus* PCR Initiative (EAPCRI) számos erőfeszítést tett a módszer klinikai alkalmazhatósága és standardizációja érdekében [40, 41], ami hozzájárult ahhoz, hogy a különböző vérmintákból és bronchoalveolaris mosásból végzett *Aspergillus*-PCR-t az új EORTC/MSGERC definíciók a valószínű invazív aspergillosis mikológiai kritériumai közé emelték (1. táblázat) [5, 32]. Ennek megfelelően számos IVD (*in vitro* diagnosztikum) jelölésű *Aspergillus*-PCR-kit érhető el kereskedelmi forgalomban. Egy metaanalízis becslése szerint a vérmintákon elvégzett egyszeri pozitív *Aspergillus*-PCR-vizsgálat szenzitivitása 79,2% (95% CI: 71,0–85,5), specificitása pedig 79,6% (95% CI: 69,9–86,6) volt. Két egymást követő pozitív eredmény esetén pedig a szenzitivitás 59,6%-nak (95% CI: 40,7–76,0), a specificitás pedig 95,1%-nak (95% CI: 87,0–98,2) adódott. A tanulmány hangsúlyozza a módszer magas negatív prediktív értékét (92–95%), amely lehetővé teheti a betegség kizárását, és feleslegessé teheti az antifungális terápia megkezdését [42]. A bronchoalveolaris mosásból végzett *Aspergillus*-PCR is hozzájárulhat az invazív aspergillosis kizárásához. A vérmintákhoz hasonlóan azonban az eredmények interpretációja nagyobb bizonytalansággal terhelt. Ez egyrészt abból adódik, hogy a bronchoalveolaris mosás mintavételezése inhereens módon variábilisabb mintatípust idéz elő, mint a vérminták. Ezenkívül nehéz meghatározni, hogy egy pozitív eredmény invazív betegségre utal-e, vagy csupán a légutak kolonizációjából adódik [31]. Ezért az ESCMID-ECMM-ERS (European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases – European Confederation of Medical Mycology – European Respiratory Society) közös irányelve csak mérsékelten ajánlja a bronchoalveolaris mosásból végzett *Aspergillus*-PCR alkalmazását az invazív aspergillosis diagnosztizálására [16]. Fontos szempont, hogy az *Aspergillus*-PCR a leghatékonyabban olyan egyének esetén alkalmazható, akik

antifungális profilaxisban nem részesültek, mivel a profilaxis csökkentheti a teszt specificitását [31, 43].

Az *Aspergillus*-PCR mellett említendő a *Pneumocystis*-PCR, a *Candida*-PCR, a *Mucorales*-PCR és a *Cryptococcus*-PCR. Ezek összességében kevésbé standardizáltak, és klinikai alkalmazhatóságuk is kevésbé tisztázott. A Fungal PCR Initiative (FPCRI) célja e hiányosságok orvoslása. Ezzel együtt számos IVD jelölésű termék elérhető kereskedelmi forgalomban [37, 44].

A *Pneumocystis*-PCR felső légúti mintákból, elsősorban bronchoalveolaris mosásból alkalmazható, és az EORTC/MSGERC definíciók a pozitív eredményt a pneumocystosis mikológiai evidenciái közé sorolják [5, 45]. A negatív eredmény kiválóan alkalmas lehet a *Pneumocystis*-pneumonia kizárására [37], azonban a bronchoalveolaris mosási minták már említett sajátságai miatt (a kolonizáció és a valódi fertőzés elkülönítésének nehézsége) a pozitív PCR-eredményt az ehhez a mintatípushoz igazított 'cut-off' (küszöb) értéket alkalmazva és a klinikai, radiológiai és laboratóriumi eredményekkel összevetve kell értelmezni [31].

A *Candida*-PCR-t túlnyomó többségben különböző vérmintákon tesztelték. Az adatok arra utalnak, hogy a módszer a hemokultúránál érzékenyebb, azonban a standardizáció és a klinikai teljesítmény relatív hiánya miatt az egyik ESICM (European Society of Intensive Care Medicine)/ESCMID munkacsoport ajánlása hangsúlyozza, hogy kizárólag egyéb vizsgálatokkal (például hemokultúra, β -D-glükán-teszt) együtt alkalmazható [31, 44, 46]. Magas negatív prediktív értéke miatt a *Candida*-PCR segítséget jelenthet az invazív candidiasis kizárásában [31]. Az EORTC/MSGERC definíciók a *Candida*-PCR-t nem sorolták be az invazív candidiasis mikológiai evidenciái közé, azonban a PCR és a mágneses rezonancia kombinációjára épülő, FDA által jóváhagyott T2Candida platformot igen [31, 45].

A szérumból elvégzett *Mucorales*-PCR-vizsgálat a konvencionális módszerekhez képest több nappal meggyorsíthatja a mucormycosis diagnózisának felállítását, és a bronchoalveolaris mosással végzett vizsgálatok is ígéretesek [37, 44]. Ezenfelül az FPCRI által koordinált, 12 laboratóriumot bevonó tesztek is átáramasztják a módszer klinikai alkalmazhatóságát [47]. Bár a *Mucorales*-PCR az EORTC/MSGERC munkájában még nem jelenik meg a mucormycosis evidenciái között, az ECMM-MSGERC irányelve már beépítette az alkalmazható diagnosztikai módszerek közé [5, 15].

A *Cryptococcus*-PCR elsősorban liquormintából alkalmazható, e kórokozó esetén azonban a szerológiai tesztek egyszerű elérhetősége és kiváló teljesítménye miatt a módszerre kevés klinikai igény mutatkozik, és nagyobb nemzetközi irányelvek sem fogalmaznak meg ajánlásokat a módszerrel kapcsolatban [5, 18].

Tapasztalataink szerint a kórokozók 'real-time' PCR-en alapuló azonosítására a formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintákból izolált DNS is alkalmazható lehet, és esetenként a szekvenálásnál gyorsabban teheti azt lehe-

tővé. Több különböző PCR együttes alkalmazását indokolhatja, ha a szövettani vizsgálat során bizonytalanul megítélhető, átmeneti morfológiával rendelkező gombaelemek mutatkoznak. Például az *Aspergillus*-PCR és a *Mucorales*-PCR együttes használata segíthet eldönteni a szöveteket megtámadó gomba típusát, illetve megállapítani a kevert, egyszerre többféle gomba által okozott fertőzés fennállását.

Megemlítendő, hogy kórokozó gombák kimutatására használatban vannak szindrómaspecifikus PCR-panelek is. Ezek során a PCR nem kifejezetten egy kórokozó gombacsoportot céloz meg, hanem egy adott tünetegyüttest kiváltani képes számos patogént egyszerre. Idetartoznak például a központi idegrendszeri fertőzések diagnosztikájára kidolgozott BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis panelek (BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT, USA), amelyek virális és bakteriális agensek mellett *Cryptococcus* fajokat is képesek detektálni [31].

Meghatározás Sanger-szekvenálással

A DNS azon rövidebb, általában 1000 bázispárnál nem hosszabb szakaszait, amelyek variabilitásuk következtében alkalmasak az élőlények rendszertani hovatartozásának (például faji vagy nemzeti szintű) meghatározására, DNS-vonalkódoknak nevezzük [48]. A gombák esetén több ilyen lókus van használatban, amelyek közül kiemelkednek a riboszomális génkomplex egyes szakaszai: az ITS (internal transcribed spacer), a kis riboszomális alegységet (SSU = small subunit, 18S rDNS) kódoló szakasz egy része és a nagy riboszomális alegységet (LSU = large subunit, 28S rDNS) kódoló szakasz egy része (2. ábra). A riboszomális gének a genomon belül számos kópiában megtalálhatók [49, 50]. Ez elősegíti a PCR általi amplifikálhatóságot, amely a sikeres Sanger-szekvenálás egyik feltétele. Több DNS-szakasz szisztematikus tesztelése után a gombák elsődleges, univerzális DNS-vonalkódjaként az ITS-régiót fogadták el [50]. Az ITS-régió a variábilis ITS1 és ITS2 szakaszokból áll, amelyeket a konzervatív szekvenciájú 5,8S riboszomális RNS-t kódoló rövid szakasz választ el (2. ábra). A humán kórokozó gombák nagy része, ~75%-a az ITS-szekvenciája alapján helyesen, általában faji szinten azonosítható. Problémát jelent azonban, hogy a meghatározáshoz használt nyilvános nukleinsav-adatbázisokba rossz minőségű szekvenciák és hibásan meghatározott gombákból származó szekvenciák is bekerülhetnek, ami téves identifikáláshoz vezethet. Ezért az International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) egy mikológiai laboratóriumokból álló nemzetközi konzorcium révén saját adatbázist hozott létre. Ezt összesen 421 gombafajból származó, kizárólag minőség-ellenőrzött ITS-szekvenciákból állították össze. Az adatbázisban a vizsgált szekvencia egyszerűen összevethető a referenciaszekvenciákkal, ami segítheti a humán kórokozó gombák meghatározását [49, 51].

Az ITS segítségével azonban a gombák egy része nem határozható meg faji szinten (például egyes *Fusarium* fajok) [51]. Ezért keresés indult olyan másodlagos gomba-DNS-vonalkódok irányába, amelyek az ITS-t kiegészítve fokozzák az identifikáció hatékonyságát. A vizsgálatok alapján a *transzlációs elongációs faktor-1 α* (*TEF1 α*) gén egy szakasza tűnt a legmegfelelőbbnek erre a célra [52]. Ennek nyomán az ISHAM adatbázisát kibővítették közel 200 humán patogén gombafajt reprezentáló, minőség-ellenőrzött *TEF1 α* -szekvenciával [26]. A kiegészített adatbázis tesztelése során pontosabb meghatározás vált lehetővé több gombacsoport (például *Scedosporium* fajok) esetében [53].

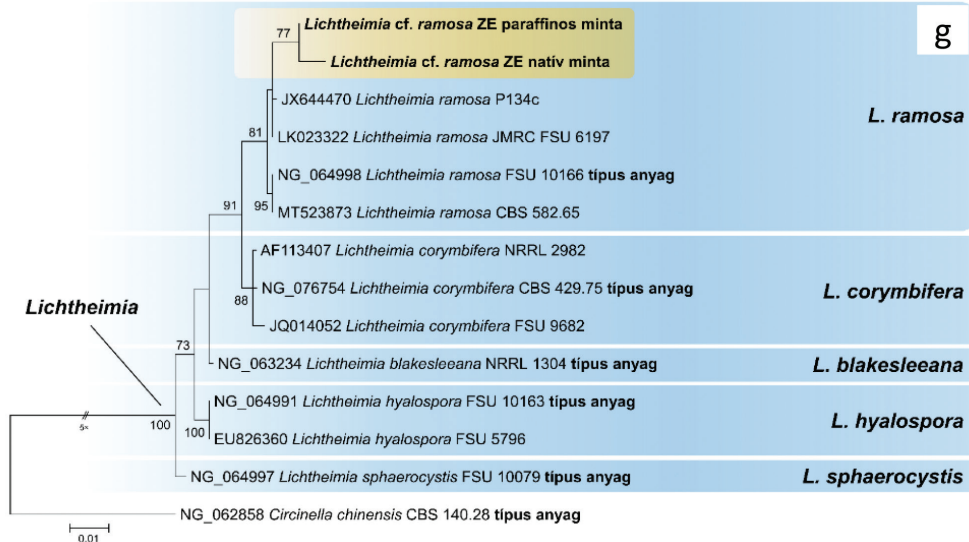
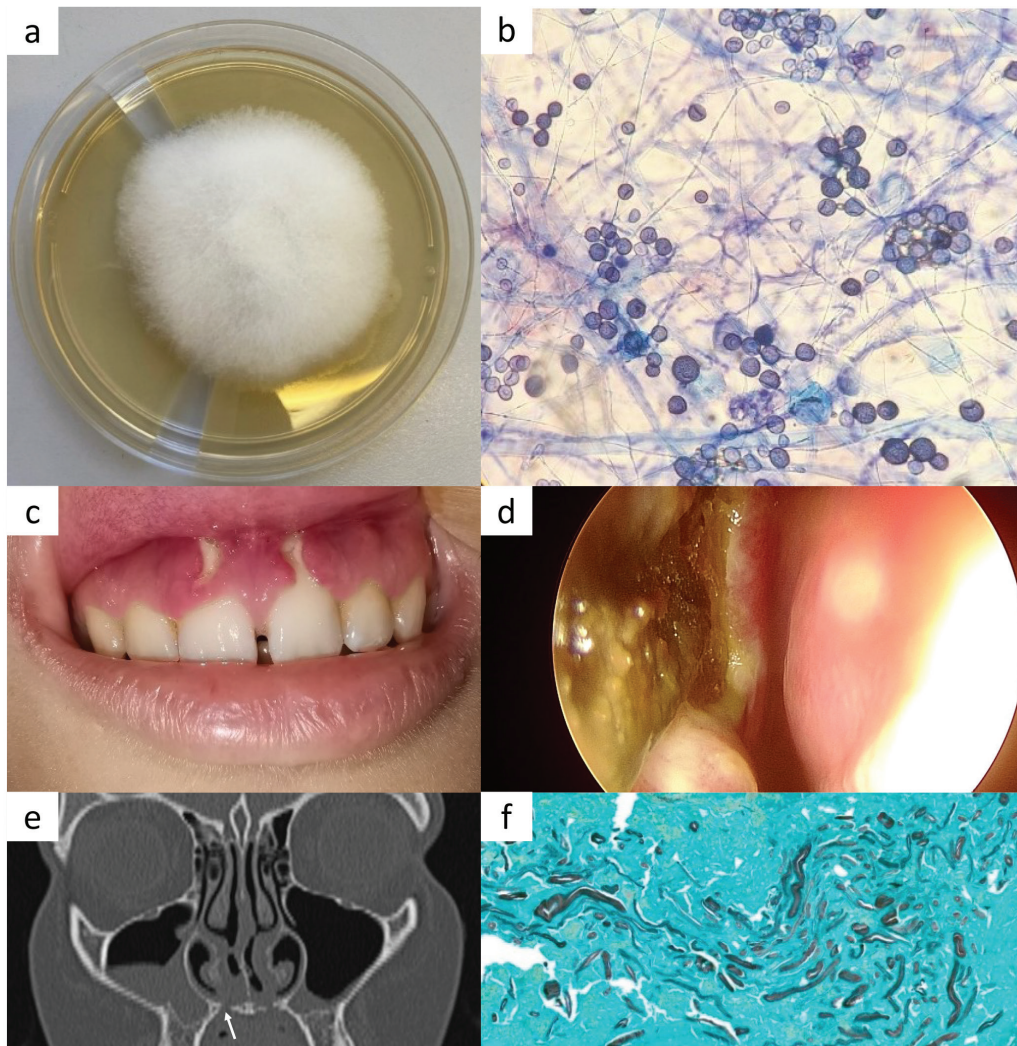
Egyes gombacsoportok esetén azonban a *TEF1 α* sem rendelkezik megfelelő feloldóképességgel ahhoz, hogy a közeli rokon vagy az ún. kriptikus fajokat megkülönböztesse. A kriptikus fajok hagyományos mikrobiológiai módszerekkel (például morfológia, biokémiai tesztek) megkülönböztethetetlenek, molekuláris módszerekkel azonban meghatározhatók [54, 55]. Az *Aspergillus* nemzetségen belül például az ITS- és a *TEF1 α* -szekvenciák ismeretében is gyakran csak fajkomplex szintű meghatározás lehetséges. A fajkomplex nem rendszertani kategória, hanem az orvosi mikológiában használt gyakorlati kifejezés, amely hasonló fenotípusú kriptikus fajok csoportját jelenti. Az egészségügyi rutindiagnosztikában a fajkomplexeken belüli pontos faji meghatározás egyelőre nem terjedt el, mivel kérdéses, hogy befolyásolná-e a terápiás algoritmust [51, 55]. Az utóbbi években azonban több tanulmány hívta fel a figyelmet arra, hogy érdemes lehet a pontos faji szintű meghatározás, mivel a kriptikus fajok eltérő érzékenységgel rendelkezhetnek az egyes antimikotikumokra nézve [54, 56, 57]. Az *Aspergillus* nemzetség esetén többek között a *kalmomodulin* vagy a *β -tubulin* gének szekvenciái alkalmasak a pontos faji identifikációra [57, 58].

Gyakorlati szempontból a DNS-szekvencián alapuló identifikáció egyszerűbb módja az, amikor a meghatározott szekvenciát az alkalmazott adatbázisban (például NCBI GenBank, ISHAM Barcoding Database, MycoBank) tárolt referenciaszekvenciákkal vetik össze, és a szekvenciahasonlóságot százalékos formában kifejezik. Amennyiben a hasonlóság mértéke meghalad egy előre meghatározott határértéket, akkor feltételezhető, hogy a meghatározni kívánt gomba ugyanahhoz a fajhoz tartozik, mint amelyet a referenciaszekvencia jelöl [59]. Például az ISHAM Barcoding Database (ITS, *TEF1 α*) esetén a 98,5%-os szekvenciahasonlóság alapján javasolják a fajok meghatározását [49, 53]. Bár a módszer a klinikai igénynek megfelelően gyors, kevés szakértelmet igényel, és számos, klinikai szempontból releváns gombafaj esetén megfelelően működik, mégis túlegyszerűsített, ami akár téves meghatározáshoz vezethet. Ezért bizonytalan esetekben (például több fajnévvel párosított referenciaszekvencia is nagyobb, mint 98,5%-os hasonlósággal bír a molekuláris vizsgálat során meghatározott szekvenciával) megbízhatóbb további lókuszok (például SSU,

LSU) szekvenálásának bevonása és a meghatározott DNS-szekvenciák referenciaszekvenciákkal együtt történő filogenetikai vizsgálata. Ennek során a meghatározást a szekvenciáknak a megfelelő elemzési módszerek és statisztikai számítások segítségével készített törzsfákon lévő helyzete adja meg [59, 60]. A törzsfák készítése során az általunk vizsgált gomba adott DNS-szekvenciáit vetjük össze az ennek a legközelebbi rokonságába (például nemzetségbe) tartozó fajokból származó, megbízható referenciaszekvenciákkal, amelyek lehetőleg típus-törzsekből, de mindenképpen minőségi, ellenőrizhető publikációkból származnak. Az alkalmazott filogenetikai számításokkal a különböző fajok DNS-szekvenciáiban megfigyelhető eltérések (például pontmutációk) alapján megbecsülhető a törzsfajlás során a fajok között kialakult filogenetikai távolság. Példaként említjük a 'maximum likelihood' módszereket, amelyek a nukleotidszekvencia-evolúció sztochasztikus modelljén alapulva számítják a legnagyobb valószínűségi értékekkel rendelkező törzsfákat (például *3/g ábra*). Emellett többféle egyéb megközelítés (például 'neighbor-joining' [szomszédösszevonó módszer], parszimónián alapuló módszerek, Bayes-alapú számítások) létezik, amelyek megfelelő alkalmazásában értékes hozzájárulást jelenthet bioinformatikus és/vagy filogenetikai módszerekben jártas mikológus bevonása [59, 60]. Bár erre vonatkozó konkrét ajánlást nem ismerünk, amennyiben a különböző módszerek ellentmondásos eredményre vezetnek, a biztosnak tűnő ismeret leletezését tartjuk megfelelőnek. Például amennyiben különböző módszerek eltérő *Rhizopus* fajokra utalnak, a leletben *Rhizopus* sp. feltüntetését javasoljuk.

Számos nemzetközi irányelv fogalmaz meg ajánlást a klinikai gombaizolátumok molekuláris eszközökkel történő meghatározásával kapcsolatban, amelyek feltétele a módszer hozzáférhetővé tétele az orvosi mikrobiológiai laboratóriumok számára [15, 16, 18, 46, 61, 62]. Az ESCMID-ECMM-ERS közös irányelve például az *Aspergillus*-tenyészetek pontos faji szintű meghatározására ajánlja az ITS-, a *kalmomodulin*- és a *β -tubulin*-DNS-lókuszok meghatározását, azonban csupán az atípusos növekedésű izolátumok esetén [16]. A mucormycosis-sal kapcsolatos globális ECMM-MSGERC irányelv pedig az ITS-régió szekvenálására nézve tesz közzé erős ajánlást a pontos faji szintű meghatározás végett, és a módszert mind a morfológiai, mind a MALDI-TOF-alapú identifikációnál megbízhatóbbnak tünteti fel [15].

A gombák több DNS-vonalkódja nemcsak tiszta tenyészetből, hanem közvetlenül gomba által megfertőzött szövetmintából is meghatározható. Ezáltal olyan esetekben is lehetővé válhat a patogén gomba meghatározása és az ennek megfelelő terápia választása, amikor tenyésztés nem történt vagy eredménytelenül végződött. A módszer formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintákból is kivitelezhető, azonban kisebb hatékonysággal, mint natív szövetből. Ennek egyik oka, hogy a formalinos fixálás során a DNS épsége fragmentálódás és



3. ábra

Mucormycosisos esetek. *Cunninghamella echinulata* (a) tenyésztése Sabouraud-táptalajon és (b) fénymikroszkopos képe metilénkékfestés után. (c) A nekrozis kezdeti jelei, (d) a porcnekrozis endoszkopos képe (nasalis septum), (e) a csontdestrukció (nyíl) CT-képe a kemény szájpadon és (f) Gömöri–Grocott-féle festéssel jelölt hifák a szövettani metszetben. (g) Reprezentatív, jól karakterizált *Lichtheimia* törzsekből származó (kék), valamint a bemutatott esethez tartozó szövettani mintákból (sárga) meghatározott SSU-szekvenciák alapján készített 'maximum likelihood' (ML) filogenetikai fa. Az elágazásoknál a 70%-nál nagyobb ML 'bootstrap' értékek vannak feltüntetve. A szekvenciák GenBank szerinti azonosító számai a fajnevek előtt, a törzsek neve pedig a fajnevek mögött található. Külöspontként a *Circinella chinensis* CBS 140.28 szekvenciája szolgált. A mércse 100 karakteren 1 változásnak megfelelő ághosszat jelöl

CT = komputertomográfia; SSU = a 18S riboszomális alegység RNS-ét kódoló DNS-szakasz

keresztkötések kialakulása folytán romlik. Mivel a formalinban fixált, paraffinba ágyazott minták nem tekinthetők sterilnek, fokozottan számon kell tartani annak lehetőségét, hogy a meghatározott DNS-szekvencia környezeti kontamináció következménye is lehet [29, 63–65]. Mindezek figyelembevételével a nemzetközi definíciók és irányelvek szerint ajánlott a gombák DNS-szekvenálással történő meghatározását natív szövetmintából vagy formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintából elvégezni, ám kizárólag akkor, ha a szövettani vizsgálat gomba jelenlétét már igazolta (1. táblázat). Ezenkívül a szekvenálás eredménye akkor fogadható el, ha az összhangban van a szövettani mintában megfigyelt morfológiával [5, 15, 29, 61, 66]. A gombák ITS-, LSU- és SSU-lókuszaik megfelelő szakaszai specifikusan amplifikálhatók és szekvenálhatók közvetlenül humán szövetmintából [29, 64, 67]. Ezzel szemben tapasztalatunk szerint a *kalmodulin*- vagy a *TEF1 α* - régiók Sanger-szekvenálása az ilyen mintákból kiindulva problémás, mert az irodalomban az erre a célra leggyakrabban alkalmazott primerek a megfelelő humán ortológ szekvenciákhoz is nagy affinitással kötődnek, így kevert szekvenciák generálódnak, ami nem teszi lehetővé az azonosítást.

Összegezve, tiszta tenyésztéssel elsősorban az ITS meghatározása ajánlott, amelyet másodlagos vonalkódként a *TEF1 α* -lókuszt is kiegészíthet [26, 51, 53]. Továbbá *Aspergillus*ok esetén, amennyiben valamilyen okból szükséges a fajkomplexeken belüli fajok pontos meghatározása, a *kalmodulin* vagy a β -*tubulin* gén adott szakaszainak ismerete lehet célravezető [16, 57, 58]. Közvetlenül szövetmintából kiindulva is legfőképpen az ITS szekvenálása javasolt, amelyet kiegészíthetnek az LSU- vagy SSU- régiók is [15, 29]. Bár változatossága révén az ITS alkalmasabb a fajok elkülönítésére, mint az utóbbi két lókuszt, azonban szövetből történő amplifikálhatósága korlátozott lehet. Példa erre, hogy tapasztalataink szerint a mucormycosist okozó gombák ITS-ének szövetből történő meghatározása rossz hatásfokú a vizsgálatához általánosan használt molekuláris módszerekkel és alkalmazott primerekkel, míg az SSU-szekvenciák meghatározása gyakrabban sikeres. Ezzel összhangban van, hogy a *Mucorales* rendbe tartozó gombák szövetmintából kiinduló, Sanger-szekvenálással történő meghatározására a szakirodalomban a leggyakrabban ezt a lókuszt alkalmazzák [például 68–70], és az ECMM-MSGERC irányelvében is szerepel [15].

Meghatározás újgenerációs szekvenálással

Számos tanulmány rámutatott, hogy az újgenerációs szekvenálás különböző platformjai és módszerei (például Illumina, Ion torrent, PacBio, Oxford Nanopore) eredményesen használhatók kórokozó gombák közvetlenül szövetmintából történő azonosítására. Ezek a megközelítések előnyökkel rendelkeznek a Sanger-szekvenáláshoz képest, többek között azért, mert nem csupán a gombák egyes DNS-vonalkód-szakaszainak, hanem akár egész

genomjának szekvenciája kinyerhető. Ebből adódóan nemcsak a kórokozó faji azonosítása válik megbízhatóbbá, hanem akár egyedi, törzsszintű kimutatása is, valamint a gombaellenes szerekkel szembeni rezisztenciamutációk jelenléte is detektálhatóvá válik. Az újgenerációs szekvenálási technológiák egyes alkalmazásai pedig akár 24–48 órára csökkenthetik a minták beérkezésétől az eredmény közléséig eltelt időt [31, 71–74].

Mindezek ellenére jelenleg több tényező nehezíti az újgenerációs szekvenálás gombafertőzésekkel kapcsolatos rutindiagnosztikai felhasználásának elterjedését. Ezek között olyan technikai problémák is szerepelnek, mint a szekvenálási hibaráta csökkenésének szükségessége (például Oxford Nanopore), a humán eredetű szekvenciák kiszűrése, az elérhető referenciagenomok korlátozott mennyisége, a teljes genomelemzés időigénye és a nagy bioinformatikai kapacitás szükségessége. A legfőbb akadályt azonban az újgenerációs szekvenálás nagy költségigénye jelenti [31, 73, 74]. Habár teljes genomok és sok minta egyszerre történő meghatározása esetén az újgenerációs szekvenálás jelentős megtakarítással jár, egy-egy minta esetenkénti meghatározásakor nem költséghatékony. Ezekből adódóan a nagyobb nemzetközi irányelvek nem tartalmazzak kifejezetten újgenerációs szekvenálásra vonatkozó ajánlásokat [15, 61, 62, 66], illetve azt olyan eszközként tüntetik fel, amelynek klinikai validációja még folyamatban van [29], és térnyerésére a jövőben számítani lehet [18].

Említendő az Amerikai Egyesült Államokban elérhető, a Karius cég által végzett Karius Test® (<https://kariusdx.com/>). A cég állítása szerint a teszt a vérből izolált mikrobiális sejtmentes DNS újgenerációs szekvenálásán keresztül képes kórokozók, köztük mintegy 250 patogén gombafaj azonosítására. Ígéretes, hogy az eljárás nem invazív, és leletátfordulási ideje a laboratóriumba történő beérkezéstől kb. 24 óra, azonban a módszer egyelőre igen költséges. Tanulmányok arra utalnak, hogy Karius Test® sikerrel alkalmazható lehet az invazív gombafertőzések diagnosztikájában, ám a negatív eredmény nem képes kizárni a fertőzés fennállását, különösen *Aspergillus* fajok esetén [75, 76].

Gyógyszerrezisztens mutációk azonosítása

Mivel egyes kórokozó gombatörzsek rezisztens bizonyos gombaellenes hatóanyagokra nézve, a mikrobiológiai laboratóriumokban standardizált módon vizsgálják az izolátumok különböző antimikotikumokkal szembeni érzékenységét. Ez a klinikusoknak támpontot nyújthat a megfelelő terápia kiválasztásában, azonban a folyamat időigényes lehet, és negatív tenyésztési eredmény esetén nem alkalmazható. Több génben azonosítottak ún. rezisztenciamutációkat, amelyek jelenléte egy adott hatóanyaggal szembeni rezisztenciával társul. Azolrezisztenciát okozhatnak például a *Candida* gombák genomjában kódolt *ERG11*, *ERG3* és *TAC1* gének, valamint az *Aspergillus*okban található *CTP51A* gén egyes mutációi.

Az FKS génekben ismertek olyan mutációk, amelyek a *Candidák* esetén rezisztenciát okoznak az echinokandinokkal szemben. E mutációk tenyészetekből történő kimutatása előnyös lehet a terápiaválasztásban, azonban nem helyettesítheti a klasszikus, fenotípus-alapú rezisztenciavizsgálatokat. A rezisztenciamutációk közvetlenül a gomba által fertőzött humán mintákból is azonosíthatók lehetnek, ami különösen jelentős olyan helyzetben, amikor a tenyésztés negatív vagy nem érhető el. A módszer azonban kevésbé hatékonyan kivitelezhető, mint a tenyészetek esetén. Bár a gombákban fellelhető rezisztenciamutációk kimutatása ígéretes megközelítés, még keveset tudunk a gombaellenes szerekkel szembeni rezisztencia genetikai hátteréről, és a rutindiagnosztikai alkalmazás egyelőre nem jellemző [31, 37, 72].

Molekuláris gombadiagnosztikai lehetőségek a Dél-pesti Centrumkórház – Országos Hematológiai és Infektológiai Intézetben és a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében

A Dél-pesti Centrumkórház – Országos Hematológiai és Infektológiai Intézetben többféle molekuláris gombadiagnosztikai vizsgálat érhető el. Idetartozik a pánfungális PCR, a vér/szérum és a bronchoalveolaris mosási minták esetén igényelhető *Aspergillus*-qPCR, valamint a bronchoalveolaris mosásból végezhető *Pneumocystis*-qPCR. Ezenkívül a meningitis-PCR-panel keretein belül lehetőség van *Cryptococcus* kimutatására.

Az utóbbi években a Semmelweis Egyetemen működő Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben is beállításra kerültek molekuláris gombadiagnosztikai vizsgálatok. A mikrobiológiai laboratóriumok munkáját tenyészetekből végzett szekvenálási vizsgálattal tudjuk segíteni, amely teszteleseink során 100%-ban sikeres volt. Ehhez a kitenyésztett gombákból származó DNS-kivonatokat vagy a tenyészetből származó gombaképleteket (70%-os etanolban vagy ún. GT-pufferben fixálva) fogadunk kiindulási anyagként. Alapvetően az ITS- és a *TEF1 α* -szakaszok szekvenálását végezzük el, az *Aspergillusok* esetén azonban lehetőség van a *kalmodulin* szekvenálására, ami lehetővé teszi a pontos fajmeghatározást a fajkomplexeken belül. Közvetlenül szövetmintából is beállításra kerültek molekuláris gombavizsgálatok. Intézetünkben a szövetekből formalinban fixált, paraffinba ágyazott minták készülnek, amelyekben patológusok azonosítják a gombaképleteket. Az ilyen gombapozitív, formalinban fixált, paraffinba ágyazott minták esetén *Aspergillus*-PCR, *Mucorales*-PCR, *Candida*-PCR segítségével, valamint az ITS-, az LSU- és a *Mucorales* gombák esetén az SSU-régió Sanger-szekvenálásával tudunk hozzájárulni a kórokozó meghatározásához. Teszteleseink során az esetek kb. 80%-ában nemzetségszinten és 50%-ban faj/fajkomplex szinten volt azonosítható a kór-

okozó gomba. A vizsgálat elvégzéséhez szövettani célra vett friss mintát, illetve formalinban fixált, paraffinba ágyazott blokkokat fogadtunk a hozzájuk tartozó metaszetekkel együtt.

Esetismertetések

Az alábbiakban két esetet ismertetünk, amelyeknél a molekuláris vizsgálattal sikerült azonosítani a kórokozó gombát. Az első esetben klinikai mikrobiológiai laboratórium számára végeztük a vizsgálatot gombatenyészetből származó DNS-kivonattal, míg a második esetben közvetlenül műtéti reszekátumból.

Első eset

A 48 éves nőbeteg kórelőzményében primer amyloidosis miatt 2012-ben végzett autológ, majd 2019-ben allogén csontvelő-transzplantáció szerepel. Hematológiai alapbetegségének relapsusa miatt 2023 decemberében haploidentikus donorától donorlymphocyta-infúziót kapott. Ezt követően bél graft-versus-host betegség alakult ki. Ennek szövődményeként subfebrilitas, gastrointestinalis vérzés lépett fel, így a területi sürgősségi osztály érintésével a Dél-pesti Centrumkórház – Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet Hematológiai Osztályára került átvételre. Az alkalmazott terápia ellenére állapota romlott, keringési elégtelenség és tachydyspnoe miatt az Intenzív Terápiás Osztályra helyezték át, ahol kombinált antiinfektív, valamint immunszuppresszív terápiban részesült, folyamatos mikrobiológiai mintavételezések mellett. Számos bakteriális és virális infekció igazolódott (*Campylobacter* sp., enteropatogén *Escherichia coli* pozitívitás székletről, *E. coli* és *Enterococcus faecalis* véráramból, SARS-CoV-2, Epstein-Barr-vírus és cytomegalovírus-viraemia, influenza A-vírus és adenovírus pozitívitása bronchoalveolaris mosásból). Állapota minden intenzív terápiás törekvés ellenére progrediált, légzési elégtelensége fokozódott. Gépi lélegeztetés, maximális dózisú kettős presszortherápia, valamint folyamatos vesepótló kezelés ellenére metabolikus kisiklása befolyásolhatatlanul mélyült, végül többszervi elégtelenség tünetei között a beteg meghalt.

A tracheaváladék direkt tenyésztése során fonalgomba-infekció gyanúja vetődött fel. A kitenyésztett fonalgomba eozin-metilénkék és Columbia véres agaron is nőtt, fehér, bolyhos légmicéliumokat alkotva. Sabouraud-táptalajon 37 °C-on nőtt a legkifejezettebben (3/a ábra). A mikroszkópos képen rövid, lateralis nem szeptált hifaágak voltak láthatók, amelyek vége kiszélesedő vesiculában végződött (3/b ábra). Spórái ovaloid alakúak voltak, sima felszínnel, néhol finom szemcsészettséggel. A tenyészetet többszöri próbálkozás után sem sikerült azonosítani, végül MALDI-TOF tömegspektrometriás módszerrel, valamint a mikroszkópos kép alapján a törzset a *Mucoromycetes* osztályba lehetett besorolni. A tenyészet egy része fixált formában a Semmelweis

Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetébe került továbbításra, molekuláris azonosítás céljából. A vizsgálati mintában az ITS- és a *TEF1 α* -lókuszok szekvenciái kerültek meghatározásra (NCBI GenBank azonosítók: PQ636393, PQ633225). Mindkét lókusz esetén több mint 98,5%-os hasonlóságot mutattak a *Cunninghamella echinulata* fajnévvel párosított referenciaszekvenciákkal. Ezek a referenciaszekvenciák ellenőrizhető publikációkból mikológiai törzsgyűjteményből származtak.

Második eset

A Semmelweis Egyetem Belgyógyászati és Hematológiai Klinikáján kezelt 19 éves nő pancytopeniája háttérben B-sejtes akut lymphoblastos leukaemia igazolódott. Az indukciós kemoterápia első blokkja után a beteg soron kívül érkezett kontrollra a szájában észlelt elváltozás (3/c ábra) miatt. A szájsebészeti konzílium akut nekrotizáló ulceratív parodontitist véleményezett, antibiotikumterápia indult. A kezdeti képalkotó vizsgálatok csontérintettséget nem igazoltak, a további kontroll során azonban már porcnekrózis (3/d ábra) és csontérintettség is látszott (3/e ábra). Az invazív gombainfekció mellett felmerült az actinomycosis és az aszeptikus csontnekrózis lehetősége is. A galaktomannán- és 1,3- β -D-glükánvizsgálatok negatív eredményt adtak.

Bár a beteg mindvégig láztalan volt, fiziológiás vércép és CRP-érték mellett állapota két hét alatt progrediált: porcnekrózis, nyeregorr alakult ki. Fül-orr-gégészeti konzílium során vett szövettani mintában angioinvaszív fonalgomba-infekció igazolódott (3/f ábra), mely klinikailag a leginkább sinonasalis mucormycosisnak felelt meg. A mikrobiológiai feldolgozásra küldött minták nem hoztak eredményt.

A beteg ellátása során radikális műtéti reszekciót követően liposzómás amfotericin B adására került sor, melyet szekvenciálisan izavukonazollal folytattak, rendszeres gyógyszer-szintmérés mellett.

Az eredeti szövettani, formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintából DNS-izolálást követően pánfungális és *Mucorales*-PCR-vizsgálat történt, amelyek pozitívnak bizonyultak. Mivel az elsődleges gomba DNS-vonalkód (ITS) szekvenálása nem vezetett eredményre, nemzetközi ajánlás szerint [15] az SSU egy szakaszát szekvenálták sikeresen. A *Mucorales*-PCR-t a második, radikális műtéti reszekciós mintából izolált DNS-en is elvégezték, szintén pozitív eredménnyel. Ezt követően sor került az SSU-szekvenálásra is (NCBI GenBank azonosítók: PQ399696, PQ399697). A vizsgálat mindkét minta esetén a *Lichtheimia* faj jelenlétét igazolta, nagy valószínűséggel a *Lichtheimia ramosa* fajtét, amely ismert opportunistá humán patogén (3/g ábra). Mivel irodalmi adatok alapján a *Lichtheimia* fajok érzékenysége várható pozakonazollal szemben [77], a kezelést ezzel a szerrel folytatták, rendszeres gyógyszer-szintmérés mellett. A beteg további hematológiai kezelése jelenleg is zajlik, remisszióban van.

Következtetés

A molekuláris biológiai eszközök lényeges diagnosztikai fejlődést hoztak az orvostudomány számos területén, így a fertőző betegségek ellátása terén is. Bár a molekuláris vizsgálatok a bakteriális és virális fertőzések azonosításában általánosnak tekinthetők, a gombák okozta betegségek esetén történő alkalmazásuk csak lassan terjed. Az onkohematológiai betegek veszélyeztetett csoportot képeznek az invazív gombafertőzések tekintetében, így esetükben a patogén gombákkal kapcsolatos diagnosztikus fejlesztések különösen jelentősek lehetnek. A jelen közleménnyel fel kívánjuk hívni a figyelmet a mycosisok molekuláris diagnosztikai lehetőségeire és intézeteink példáin keresztül hazánkban való elérhetőségükre, használhatóságukra. E vizsgálatok értékének szélesebb körű felismerésével, illetve a nukleinsav-technológiák intenzív fejlődésével és gazdaságosabbá válásával a jövőben számítani lehet hozzáférhetőségük egyszerűsödésére.

Anyagi támogatás: A szerzők a kézirat elkészítése kapcsán anyagi támogatásban nem részesültek.

Szerzői munkamegosztás: A közlemény megírásában S. J., Z. E., V. E. és P. G., javításában pedig K. G. D. és B. Cs. vett részt. Az eseteket V. E. és P. G. szolgáltatta, melyekhez a molekuláris vizsgálatokat Z. E. és K. G. D. végezte el. A közlemény végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekltségek: A közlemény vonatkozásában a szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki a Dél-pesti Centrumkórház Központi Laboratórium Mikrobiológiai Profil szakembereinek a mikológiai diagnosztikában nyújtott értékes segítségükért. Hálánkat fejezzük ki továbbá a Patológiai és Rákkutató Intézet munkatársainak, kiemelten *Horváth Róbert*nek, valamint *Gudor Szilárd*nak (Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem), akik hozzájárultak a molekuláris gomba-diagnosztikai módszerek beállításához. *Szenzenstein Judit*, dr. *Gácsor Attila* és dr. *Kocsubé Sándor* (Szegedi Tudományegyetem, Mikrobiológiai Tanszék) a gomba-DNS-izolátumokkal járultak hozzá tesztelésinkhez. Köszönet illeti dr. *Irinyi Lászlót* (Westmead Institute for Medical Research, The University of Sydney), dr. *Oscar Zaragozát* (Instituto de Salud Carlos III, Madrid) és dr. *Kocsubé Sándort*, akik konzultációkkal segítették munkánkat. Nagyra értékeljük a Magyar Rákkutatás és Molekuláris Patológia Alapítvány (www.rakkutatok.hu) és a Fungal Infection Trust (Egyesült Királyság) reagensek beszerzésére biztosított anyagi támogatását.

Irodalom

- [1] Denning DW. Global incidence and mortality of severe fungal disease. *Lancet Infect Dis.* 2024; 24: e428–e438.
- [2] Bassetti M, Azoulay E, Kullberg BJ, et al. EORTC/MSGERC definitions of invasive fungal diseases: summary of activities of the intensive care unit working group. *Clin Infect Dis.* 2021; 72(Suppl 2): S121–S127.

- [3] Blot SI, Taccone FS, Van den Abeele AM, et al. A clinical algorithm to diagnose invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 186: 56–64.
- [4] Bulpa P, Dive A, Sibille Y. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2007; 30: 782–800.
- [5] Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis*. 2020; 71: 1367–1376.
- [6] Koehler P, Bassetti M, Chakrabarti A, et al. Defining and managing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: the 2020 ECMM/ISHAM consensus criteria for research and clinical guidance. *Lancet Infect Dis*. 2021; 21: e149–e162.
- [7] Young JH, Andes DR, Ardura MI, et al. Modeling invasive aspergillosis risk for the application of prophylaxis strategies. *Open Forum Infect Dis*. 2024; 11: ofae082.
- [8] Pásztor-Bazsó V, Kelemen Á, Varga Á, et al. First Hungarian report of *Geotrichum capitatum/Saprochaete capitata* infection in an immunocompromised child. [*Geotrichum capitatum/Saprochaete capitata* fertőzés első hazai esete egy immunzsuprimált gyermekben.] *Orv Hetil*. 2023; 164: 1034–1038. [Hungarian]
- [9] Sinkó J. Invasive fungal infections in patients with haematological malignancies. [Invazív gombafertőzések malignus hematológiai betegségekben.] *Magy Onkol*. 2017; 61: 75–80. [Hungarian]
- [10] Iszlai Z, Kiss-Tóth E, Karosi T. Mucormycosis of the paranasal sinuses. [Az orrmelléküregek mucormycosisa.] *Orv Hetil*. 2024; 165: 1878–1887. [Hungarian]
- [11] Lőrinczi C, Iliás Á. Esophageal candidiasis as an indicator condition. [Candidaoesophagitis mint indikátorbetegség.] *Orv Hetil*. 2023; 164: 878–880. [Hungarian]
- [12] Sinkó J, Sulyok M, Denning DW. Burden of serious fungal diseases in Hungary. *Mycoses* 2015; 58(Suppl): 29–33.
- [13] Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(Suppl 7): 19–37.
- [14] Ullmann AJ, Akova M, Herbrecht R, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(Suppl 7): 53–67.
- [15] Cornely OA, Alastruey-Izquierdo A, Arenz D, et al. Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet Infect Dis*. 2019; 19: e405–e421.
- [16] Ullmann AJ, Aguado JM, Arıkan-Akdagli S, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect*. 2018; 24(Suppl 1): e1–e38.
- [17] Maschmeyer G, Helweg-Larsen J, Pagano L, et al. ECIL guidelines for treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected haematology patients. *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71: 2405–2413.
- [18] Chang CC, Harrison TS, Bicanic TA, et al. Global guideline for the diagnosis and management of cryptococcosis: an initiative of the ECMM and ISHAM in cooperation with the ASM. *Lancet Infect Dis*. 2024; 24: e495–e512. Erratum: *Lancet Infect Dis*. 2024; 24: e485.
- [19] Willinger B, Kienzl D, Kurzai O. Diagnostics of fungal infections. In: Esser K, Kurzai O. (eds.) *The Mycota*. XII. Human Fungal Pathogens. Springer, Heidelberg, New York, 2014; pp. 229–263.
- [20] Shankland GS. Microscopy and culture of fungal disease. In: Kibbler CC, Barton R, Gow NA, et al. (eds.) *Oxford Textbook of Medical Mycology*. Oxford University Press, Oxford, 2018; pp. 283–288.
- [21] Lieberman JA, Bryan A, Mays JA, et al. High Clinical impact of broad-range fungal PCR in suspected fungal sinusitis. *J Clin Microbiol*. 2021; 59: e0095521.
- [22] Balajee SA, Sigler L, Brandt ME. DNA and the classical way: Identification of medically important molds in the 21st century. *Med Mycol*. 2007; 45:475–490.
- [23] Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev*. 2012; 25: 297–317.
- [24] Talhari S, Talhari C. Lobomycosis. *Clin Dermatol*. 2012; 30: 420–424.
- [25] Patel R. A Moldy Application of MALDI: MALDI-ToF mass spectrometry for fungal identification. *J Fungi*. 2019; 5: 4.
- [26] Meyer W, Irinyi L, Hoang MT, et al. Database establishment for the secondary fungal DNA barcode *translational elongation factor 1a (TEF1a)*. *Genome* 2019; 62: 160–169.
- [27] Guarner J, Brandt ME. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. *Clin Microbiol Rev*. 2011; 24: 247–280.
- [28] Jensen HE. (ed.) *Histopathologic diagnosis of invasive mycoses*. Routledge CRC Press, Boca Raton, FL, 2023.
- [29] Lockhart SR, Bialek R, Kibbler CC, et al. Molecular techniques for genus and species determination of fungi from fresh and paraffin-embedded formalin-fixed tissue in the revised EORTC/MSGERC definitions of invasive fungal infection. *Clin Infect Dis*. 2021; 72(Suppl 2) S109–S113.
- [30] Wickes BL, Wiederhold NP. Molecular diagnostics in medical mycology. *Nat Commun*. 2018; 9: 5135.
- [31] Kidd SE, Chen SC, Meyer W, et al. A new age in molecular diagnostics for invasive fungal disease: are we ready? *Front Microbiol*. 2020; 10: 2903.
- [32] Acet-Öztürk N, Ömer-Topçu D, Vurat-Acar K, et al. Impact of revised EORTC/MSGERC 2020 criteria on diagnosis and prognosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies undergoing bronchoscopy. *J Mycol Med*. 2022; 32: 101304.
- [33] Fierer N, Jackson JA, Vilgalys R, et al. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71: 4117–4120.
- [34] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*. 2008; 3: 1101–1108.
- [35] Czurda S, Lion T. Broad-spectrum molecular detection of fungal nucleic acids by PCR-based amplification techniques. *Methods Mol Biol*. 2017; 1508: 257–266.
- [36] Valero C, de la Cruz-Villar L, Zaragoza Ó, et al. New panfungal real-time PCR assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol*. 2016; 54: 2910–2918.
- [37] White PL, Barnes RA. Molecular diagnosis of fungal disease. In: Kibbler CC, Barton R, Gow NAR, et al. (eds.) *Oxford Textbook of Medical Mycology*. Oxford University Press, Oxford, 2018; pp. 313–326.
- [38] Cuenca-Estrella M. Guidelines for the diagnosis of fungal disease. In: Kibbler CC, Barton R, Gow NAR, et al. (eds.) *Oxford Textbook of Medical Mycology*. Oxford University Press, Oxford, 2018; pp. 327–334.
- [39] Pfaller MA, Diekema DJ. Unusual fungal and pseudofungal infections of humans. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 1495–1504.
- [40] White PL, Wingard JR, Bretagne S, et al. *Aspergillus* polymerase chain reaction: systematic review of evidence for clinical use in comparison with antigen testing. *Clin Infect Dis*. 2015; 61: 1293–1303.
- [41] White PL, Bretagne S, Klingspor L, et al. *Aspergillus* PCR: one step closer to standardization. *J Clin Microbiol*. 2010; 48: 1231–1240.
- [42] Cruciani M, Mengoli C, Barnes R, et al. Polymerase chain reaction blood tests for the diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised people. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019; 9: CD009551.

- [43] Cruciani M, White PL, Mengoli C, et al. The impact of anti-mould prophylaxis on *Aspergillus* PCR blood testing for the diagnosis of invasive aspergillosis. *J Antimicrob Chemother.* 2021; 76: 635–638.
- [44] White PL, Alanio A, Brown L, et al. An overview of using fungal DNA for the diagnosis of invasive mycoses. *Expert Rev Mol Diagn.* 2022; 22: 169–184.
- [45] Lagrou K, Chen S, Masur H, et al. *Pneumocystis jirovecii* disease: basis for the revised EORTC/MSGERC invasive fungal disease definitions in individuals without human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis.* 2021; 72(Suppl 2): 114–120.
- [46] Martin-Loeches I, Antonelli M, Cuenca-Estrella M, et al. ESICM/ESCMID task force on practical management of invasive candidiasis in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2019; 45: 789–805.
- [47] Rocchi S, Scherer E, Mengoli C, et al. Interlaboratory evaluation of Mucorales PCR assays for testing serum specimens: a study by the fungal PCR initiative and the Modimucor study group. *Med Mycol.* 2021; 59: 126–138.
- [48] Dasmahapatra KK, Mallet J. Taxonomy: DNA barcodes: recent successes and future prospects. *Heredity* 2006; 97: 254–255.
- [49] Irinyi L, Lackner M, de Hoog GS, et al. DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals. *Fungal Biol.* 2016; 120: 125–136.
- [50] Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 6241–6246.
- [51] Irinyi L, Serena C, Garcia-Hermoso D, et al. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database – the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Med Mycol.* 2015; 53: 313–337.
- [52] Stielow JB, Lévesque CA, Seifert KA, et al. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia* 2015; 35: 242–263.
- [53] Hoang MT, Irinyi L, Chen SC, et al. Dual DNA barcoding for the molecular identification of the agents of invasive fungal infections. *Front Microbiol.* 2019; 10: 1647.
- [54] Howard SJ. Multi-resistant aspergillosis due to Cryptic species. *Mycopathologia* 2014; 178: 435–439.
- [55] de Hoog GS, Haase G, Chaturvedi V, et al. Taxonomy of medically important fungi in the molecular era. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13: 385–386.
- [56] Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M. Antifungal susceptibility profile of Cryptic species of *Aspergillus*. *Mycopathologia* 2014; 178: 427–433. Erratum: *Mycopathologia* 2015; 179: 333–334.
- [57] Gautier M, Normand AC, Ranque S. Previously unknown species of *Aspergillus*. *Clin Microbiol Infect.* 2016; 22: 662–669.
- [58] Houbraken J, Kocsubé S, Visagie CM, et al. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): an overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Stud Mycol.* 2020; 95: 5–169.
- [59] Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, et al. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *J Nat Prod.* 2017; 80: 756–770.
- [60] Lücking R, Aime MC, Robbertse B, et al. Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? *IMA Fungus* 2020; 11: 14.
- [61] Chen SC, Perfect J, Colombo AL, et al. Global guideline for the diagnosis and management of rare yeast infections: an initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM. *Lancet Infect Dis.* 2021; 21: e375–e386. Erratum: *Lancet Infect Dis.* 2021; 21: e363. Erratum: *Lancet Infect Dis.* 2024; 24: e485.
- [62] Hoenigl M, Salmanton-García J, Walsh TJ, et al. Global guideline for the diagnosis and management of rare mould infections: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the International Society for Human and Animal Mycology and the American Society for Microbiology. *Lancet Infect Dis.* 2021; 21: e246–e257. Erratum: *Lancet Infect Dis.* 2021; 21: e81.
- [63] Campos PF, Gilbert TM. DNA extraction from formalin-fixed material. In: Shapiro B, Hofreiter M. (eds.) *Ancient DNA.* Methods Mol Biol. Humana Press, Totowa, NJ, 2012; pp. 81–85.
- [64] Gomez CA, Budvytiene I, Zemek AJ, et al. Performance of targeted fungal sequencing for culture-independent diagnosis of invasive fungal disease. *Clin Infect Dis.* 2017; 65: 2035–2041.
- [65] Moncada PA, Budvytiene I, Ho DY, et al. Utility of DNA sequencing for direct identification of invasive fungi from fresh and formalin-fixed specimens. *Am J Clin Pathol.* 2013; 140: 203–208.
- [66] Douglas AP, Smibert OC, Bajel A, et al. Consensus guidelines for the diagnosis and management of invasive aspergillosis, 2021. *Intern Med J.* 2021; 51(Suppl 7): 143–176.
- [67] Hammond SP, Bialek R, Milner DA, et al. Molecular methods to improve diagnosis and identification of mucormycosis. *J Clin Microbiol.* 2020; 49: 2151–2153.
- [68] Gholinejad-Ghadi N, Shokohi T, Seifi Z, et al. Identification of *Mucorales* in patients with proven invasive mucormycosis by polymerase chain reaction in tissue samples. *Mycoses* 2018; 61: 909–915.
- [69] Rickerts V, Just-Nübling G, Konrad F, et al. Diagnosis of invasive aspergillosis and mucormycosis in immunocompromised patients by seminested PCR assay of tissue samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006; 25: 8–13.
- [70] Bialek R, Konrad F, Kern J, et al. PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol.* 2005; 58: 1180–1184.
- [71] Zhang X, Zhang L, Li Y, et al. Clinical performance of metagenomic next-generation sequencing for diagnosis of invasive fungal disease after hematopoietic cell transplant. *Front Cell Infect Microbiol.* 2024; 14: 1210857.
- [72] Consortium OPATHY, Gabaldón T. Recent trends in molecular diagnostics of yeast infections: from PCR to NGS. *FEMS Microbiol Rev.* 2019; 43: 517–547.
- [73] Hoang MTV, Irinyi L, Hu Y, et al. Long-reads-based metagenomics in clinical diagnosis with a special focus on fungal infections. *Front Microbiol.* 2022; 12: 708550.
- [74] Tsang CC, Teng JL, Lau SK, et al. Rapid genomic diagnosis of fungal infections in the age of next-generation sequencing. *J Fungi (Basel)* 2021; 7: 636.
- [75] Huygens S, Schauwvlieghe A, Wlazlo N, et al. Diagnostic value of microbial cell-free DNA sequencing for suspected invasive fungal infections: a retrospective multicenter cohort study. *Open Forum Infect Dis.* 2024; 11: ofae252.
- [76] Hong DK, Blauwkamp TA, Kertesz M, et al. Liquid biopsy for infectious diseases: sequencing of cell-free plasma to detect pathogen DNA in patients with invasive fungal disease. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018; 92: 210–213.
- [77] Carvalhaes CG, Rhomberg PR, Huband MD, et al. Antifungal activity of isavuconazole and comparator agents against contemporary Mucorales isolates from USA, Europe, and Asia-Pacific. *J Fungi (Basel)* 2023; 9: 241.

(Zajta Erik dr.,
Budapest, Üllői út 26., 1085
e-mail: zajta.erik@semmelweis.hu)