

## Xenorhabdus budapestensis baktérium biopreparátumának gombaellenes hatása néhány *Candida* fajtára *in vitro*

### Antifugal effect of *Xenorhabdus budapestensis* bacteria biopreparatum on some *Candida* species *in vitro*

BURGETTINÉ BÖSZÖRMÉNYI ERZSÉBET<sup>1</sup>, NÉMETH SAROLTA<sup>1</sup>,

BÉLAFINÉ BAKÓ KATALIN<sup>2</sup>, BARCS ISTVÁN<sup>1</sup>, CSIMA ZOLTÁN<sup>1</sup>, VOZIK DÁVID<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Semmelweis Egyetem, Egészségtudományi Kar, Epidemiológiai Tanszék, Budapest

<sup>2</sup>Pannon Egyetem, Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutató Intézet, Veszprém

<sup>1</sup>Department of Epidemiology, Faculty of Health Sciences, Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>2</sup>University of Pannonia, Research Institute on Bioengineering, Membrane Technology and Energetics, Veszprém, Hungary

\*\*\*

DOI: 10.29179/ET-2017-4-5

**Összefoglalás:** Az invazív gombás megbetegedések előfordulása növekvő tendenciát mutat. A gombák elleni készítmények gyakori és olykor szakszerűtlen használata miatt a gombák csökkenő érzékenységet mutatnak a szerek iránt, továbbá ez a kialakult trend rezisztens patogének megjelenésének kedvez. Új hatásmechanizmusú antifungális szerek kifejlesztésére nagy szükség van. Egyik lehetőség természetes eredetű gomba ellenes hatással rendelkező fehérjék alkalmazása. *Xenorhabdus budapestensis* antifungális hatékonyságának mérése *in vitro* klinikai *Candida* fajokon (*C.albicans*, *C.lusitaniae*, *C.krusei*, *C.kefyr*, *C.tropicalis*, *C.glabrata*).

Felmértük a *Candida* fajok antimikotikumokkal szembeni érzékenységét. A *X.budapestensis* tisztított biopreparátumából (100%) és annak hígításaival (80%, 60%, 40% és 20%) agar-diffúziót végeztünk. A gátlási zónákat 24, 48 és 96 óra után mértük le. Minden *Candida* faj érzékenységet mutatott a tesztelt anyagra annak 40%-os hígítására. A gátlási zónák nagysága több nap elteltével sem csökkent. A legérzékenyebb faj a *Candida lusitaniae*, a legkevésbé érzékeny a *Candida krusei* volt. A *X. budapestensis* által termelt fehérjék feltételezhetően fungicid hatásúak, mivel a kialakult gátlási zónák nagysága tartósnak bizonyult.

**Kulcsszavak:** antifungális hatás, *Candida* species, *Xenorhabdus budapestensis*, rezisztencia

**Abstract:** The incidence of invasive fungal disease increases continuously. Because of the improper usage of antimicrobics, the fungi species have reduced susceptibility to these drugs, therefore resistant pathogens can appear. It is necessary to examine new antifungal drugs, the usage of natural antimicrobial protein could be an option. The aim of the authors was to evaluate the *in vitro* antifugal effect of *Xenorhabdus budapestensis* using *Candida* species obtained from clinical sample (*C.albicans*, *C.lusitaniae*, *C.krusei*, *C.kefyr*, *C.tropicalis*, *C.glabrata*). We have examined the antimycotic susceptbility of these *Candida* species. In our research we have used the purified fraction (100%) of *X. budapestensis* at different kind of dilution by agar diffusion method (80%, 60%, 40%, 20%). The zone of inhibition were measured within 24, 48 and 96 hours.

Every *Candida* species have shown sensitivity against the tested material from 40% dilution. The size of inhibition zone did not change several days later. The most sensitive species was *Candida lusitaniae*, the least sensitive species was *Candida krusei*. The purified fraction of *X. budapestensis* is presumably fungicid, based on the long lasting zone of inhibition.

**Keywords:** *Candida* species, antifugal effect, *Xenorhabdus budapestensis*, resistant

EGÉSZSÉGTUDOMÁNY  
HEALTH SCIENCE

Közlésre érkezett:

Submitted:

Elfogadva:

Accepted:

61/4 46-57 (2017)

61/2 46-57 (2017)

2014. április 10.

April 10 2014

2014. április 25..

April 25 2014

B. BÖSZÖRMÉNYI ERZSÉBET

Semmelweis Egyetem Egészségtud. Kar

Epidemiológiai Tanszék

1088 Budapest, Vas u. 17.

Telefon: 36-1-4864851

E-mail: boszormenyie@se-etk.hu

## Bevezetés

A sarjadzó gombák által okozott megbetegedések száma folyamatos növekedést mutat. Közöttük leggyakoribb a *Candida albicans*, a másik csoportot gyakoriságban a nem-*albicans* *Candida* speciesek alkotják (1).

*Candida albicans* a normál humán mikroflóra tagja, de bizonyos körülmények között felületi, illetve invazív gombás megbetegedéseket okoz. Biofilmet képezhet biotikus és abiotikus felületeken a tapadását adhezin anyagok segítik elő (2). Hifái különböző hidrolázok termelésére képesek, melyek a gazdasejtbe történő bejutását segítik elő. Az emberi szervezetben képesek a változatos pH-hoz és egyéb stressz faktorokhoz könnyen alkalmazkodni (3).

*Candida glabrata* a második leggyakrabban előforduló species, melyet 1917-ben izoláltak emberi székletből (4). Növekedési hőmérséklet-optimuma 37°C csak úgy, mint az egészséges emberi szervezet maghőmérséklete. Tűrőképessége a különféle stressz hatásokkal szemben igen magas. Jól tolerálja a táplálék hiányát. Az immunrendszer támadásával szemben is igen ellenálló. Azol típusú antifungális szerekekkel szemben magas rezisztenciát mutat. A sejtfalhoz adhezin nevű fehérje biztosítja a tapadását. Könnyen képez biofilmet egészségügyi eszközökön pl. katétereken (5).

*Candida lusitanae* ritkábban fordul elő, mint a többi *Candida* species. Az első közlemények 1979-ben készültek erről a fajról. Teleomorf alakja *Clavispora lusitanae*. Amphotericin B rezisztens, hemolizint termel (6). Amphotericin B iránti érzékenysége fokozható, ha flukonazollal, vagy 5-fluorocitozinnal kombinálva használják (7). A rezisztencia egyik oka az ergosterol bioszintézisének megváltozása, melynek következtében a sejtmembrán ergosterol tartalma csökken (8).

*Candida kefyr-t* 1909-ben izolálták kefirből, korábbi neve *Candida pseudotropicalis*. Teleomorf alakja a kefir élesztője, a *Kluyveromyces marxianus* (9). Ritkábban, de képes invazív fertőzést okozni, különösen a vérképzőrendszeri daganatos megbetegedésekkel párhuzamosan (10). Proteázt, hemolizint és foszfolipázt termel (6).

*Candida krusei* gyakorisága növekszik, csak úgy, mint a *Candida glabrata*-é. Fluconazole rezisztens a citokrom P450 izoenzim megváltozott működése miatt (11). Csökkent érzékenységet mutat Amphotericin B-re és flucitozinra. Biofilm képzésre hajlamos (12), valamint foszfolipáz termelésére (6).

*Candida tropicalis-t* 1910-ben írtak először *Oidium tropicale* néven. Gyakran izolált *Candida* species, főként daganatos betegeknél. Erős tapadó képességgel bír, könnyen képez biofilmet (6). Tartós katéterezés, illetve széles spektrumú antibiotikum használata jelentős mértékben növeli az előfordulását. A *Candida tropicalis* képezte biofilm mátrix

összetételében különbözik a többi fajtától, főként hexóزامint tartalmaz. Amphotericin B és fluconazol rezisztens. Virulenciáját fokozza enzimtermelése (foszfolipáz, proteáz, hemolizin) és hifaképző képessége (6). A *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* fertőzések száma is folyamatosan emelkedést mutat.

### Célkitűzés és módszertan

Munkánk célja a *Xenorhabdus budapestensis* Gram-negatív talajban élő rovar patogén baktérium által termelt antimikrobiális hatással rendelkező fehérje tesztelése 6 *Candida* fajtán (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. glabrata*). Valamennyi izolátum klinikai mintákból származik.

Kísérletünket két tényező motiválta. Az egyik a *X. budapestensis*ből készített sejtmentes fermentlé (CFCM) és annak tisztított biopreparátumának (PF) korábbi tesztelésekor kapott eredmények állatorvosi és humán fertőzésekben származó Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumokon [13,14,15,16].

A másik a *Xenorhabdus cabanillasii* baktériummal végzett kísérletek. A baktérium képes volt a *Candida* fajok mellett klinikai mintából származó fonalas gomba növekedését is gátolni többek között a *Fusarium oxysporum*-ot (17). Megjegyezzük fonalas gombákkal mi munkacsoportunk is végzett kísérleteket, (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* és *Fusarium spp*), klinikai mintákkal azonban tartósnak mondható gombaellenes hatást nem értünk el. Ezek a kísérletek bizonyítják, hogy mennyire eltérő antimikrobiális fehérjével rendelkeznek a különböző *Xenorhabdus* fajok.

A *X. budapestensis* antimikrobiális hatással rendelkező anyaga 2009-ben *bicornutin-A* néven került leírásra, mint egy hexapeptid fehérje (18). 2014-ben egy frankfurti kutatócsoport is felfigyelt a *X. budapestensis* antimikrobiális anyagaira. MALDI spektrométeres mérésekkel sikerült erről a fehérjéről kideríteni, hogy egy argininben gazdag, putrecin és phenylethylamin tartalmú hibrid molekula fehérje, mely a *fabclavin* elnevezést kapta. Továbbá a *bicornutin-A* termelésért felelős *bicA* gén 6848bp hosszúságú szakaszát is meghatározták. *E. coli DH10B* baktériumban a *bicA* gén heterológ expressziójával, sikerült a gén clustert felismerni (19).

Munkánkat a Semmelweis Egyetem Egészségtudományi Karának mikrobiológiai laboratóriumában végeztük kooperációs munka segítségével a Pannon Egyetem Biomérnöki és Membrántechnológiai Kutató Intézetével. A tesztelésben szereplő *Candida* fajokat a Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai laboratóriumától kaptuk.

### *Sejtmentes fermentlé előállításának a menete*

A *X. budapestensis* DSM-16342<sup>T</sup> EPB törzs XAMP-termelő primer variánsából készült el a sejtmentes fermentlé és a tisztított biopreparátum, mely a korábbi vizsgálatokban a legmagasabb antimikrobiális hatású anyag termelésére volt képes (20).

Az antimikrobiális hatású anyagot termelő baktériumot LB táplevesben növesztettük, 25°C hőmérsékleten rázatva (200 rpm) és 3 lépésben léptéket növelve. A stacioner fázis elérését követően centrifugáltuk a sejt-kultúrákat (15000g, 20°C, 20 perc), majd 0,22 µm pórusátmérőjű szűrővel (Merck Millipore) sejtmentesre szűrtük. Ebből készült a sejtmentes fermentlé. A sejtmentes kondicionált fermentléből további (CFCM) 3 liter mennyiség tisztításra került és ebből készült el a tisztított peptidekben gazdag (PF) frakció.

Az előkészített oldatokat 48 órán keresztül rázattuk 150 rpm fordulaton 20 g/L előzőleg desztillált vízben autokláv segítségével (121°C, 30 perc) aktivált - Amberlite® XAD 1180<sup>R</sup> kation cserélő gyantával, a bioaktív anyagok adszorbeálása érdekében. A gyanta mosása és az extrahálás ezután több lépésben, különböző töménységű metanol-oldatokkal történt, a következő sorrendben: steril desztillált víz, 500 ml 25 %-os MeOH, 3×300 ml 50 %-os MeOH, 3×300 ml 80 %-os MeOH, végül 300 ml cc. MeOH, amit 3 ml 2 N HCl-val savanyítottunk meg. A savas kémhatású, tömény metanolos frakciót - amely tartalmazza az antimikrobiális hatással rendelkező komponenseket - rotációs vákuum-desztilláció segítségével 35°C között bepároltuk hozzávetőleg 50 ml térfogatra, majd 2N NH<sub>4</sub>OH-oldat segítségével közömbösítettük pH=6 értékig. A neutralizált mintát ezután teljesen szárazra pároltuk, így nyertünk a folyamat végén 47,7 mg/ml száraz anyagtartalmú anyagot, melyet 10 ml desztillált vízben-hűtőszekrényben tároltunk steril csőben felhasználásig.

A biopreparátum tesztelését klinikai mintákon végeztük 6 *Candida* fajtán (*C.albicans*, *C.krusei*, *C.tropicalis*, *C.lusitaniae*, *C.kefyr*, *C.glabrata*). A gombák szintenyészeteiből fajtánkénti telepnyi mennyiséget vettünk fel steril oltókaccsal és azt 10 ml *Sabouraud-dextróz* gomba táplevesbe oltottuk, melyet vortexelés után 28°C-on aerob körülmények között tenyésztettünk termosztátban. A következő napon 0,5 McFarland standard sűrűsége állítottuk be a tesztelésre kiválasztott gomba kultúrákat.

Ezekből a kultúrákból kivettünk fajtánként 300-300µl-t és ezt előzetesen 54°C hőmérsékletre melegített 2,7 ml térfogatú lágy agarba kevertünk, majd egy hirtelen mozdulattal ráöntöttük a SD agar lemezekre. 20' várakozás után a lágy agar megdermedt és ezekbe készítettük steril lyukfúróval a 9 mm átmérőjű furatokat, melyek 100µl térfogatú anyagok befogadására voltak alkalmasak (21). Minden egyes lemezbe 5 furatot készítettünk.

A készen kapott törzsoldatunk 10 ml-es térfogatban (0,47mg/10ml steril desztillált vízben oldva) állt rendelkezésre ez volt 100%-os oldatunk, melyből 80%, 60%, 40% és 20%-os hígításokat készítettünk steril desztillált vízzel. A mérőoldatokat és a hígítások elkészítését

a *Clinical and Laboratory Standard Institute* által közölt makro hígításos módszerben leírtaknak megfelelően végeztük (22). A hígítások az alábbi szárazanyag koncentrációkat tartalmazták: 100% (0,47), 80% (0,38), 60% (0,28), 40% (0,19) 20% (0,095) µg/ml. Három párhuzamos sorozatot készítettünk.



**1. ábra:** Agar diffúziós technika Sabouraud agaron

**Fig.1:** Agar diffusion technique on Sabouraud agar

A tesztelésben szereplő *Candida* fajták általános gomba ellenes szerekkel szembeni érzékenységét papír diffúziós korong technikával határoztuk meg Müller Hinton” gomba agaron. Ennek megfelelően a gátlási zónák nagyságától függően megkülönböztetünk *érzékeny* (S), *mérsékelten érzékeny* (I) és *rezisztens* (R) fajokat. Akkor mondható érzékenynek az adott gombafaj, ha a kialakult gátlási zóna  $\geq 20$  mm (Griseofulvin esetén  $\geq 10$  mm). Mérsékelten érzékeny a használt antimikotikumokra, ha a mért gátlási zóna 12-19 mm. Rezisztensnek pedig akkor mondható a tesztelt *Candida* faj, ha a gátlási zóna  $\leq 11$  mm *in vitro* (23).

I. TÁBLÁZAT: *Candida* fajok antifugális hatóanyagokkal szembeni érzékenysége papír korongos technikával

TABLE I: *Candida* species antifungal drugs sensitivity results by filter paper technique

Tesztelt hatóanyagok agent	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. lusitanae</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>
Gomba eredete origin of the fungus from human specimens humán mintákból	haemo- kultúra haemo culture	kanül canule	köpet sputum	köpet sputum	seb váladék wound secretion	trachea
Econazole (10 µg)	S	S	S	S	I	I
Itraconazol (50 µg)	R	R	R	I	R	R
Flucytosine (1 µg)	R	I	R	I	R	R
Fluconazole (100 µg)	R	R	S	I	R	I
Ketoconazol (10 µg)	I	R	R	I	S	S
Griseofulvin (10 µg)	R	R	R	R	R	R
Amphotericin B (20 µg)	R	I	R	S	R	R
Clotrimazole (50 µg)	S	S	S	S	I	S
Econazole (50 µg)	S	S	S	S	S	I
Miconazole (10 µg)	R	R	R	R	R	R

Sérzékeny, sensitive, I: mérsékelten érzékeny moderately sensitive, R: rezisztens, resistant

Antimikotikum-korongok rövidítése a gyártó által megjelöltek szerint:

AMB=Amphotericin B (20µg), CLT=Clotrimazole (50 µg), FLU=Fluconazole (100 µg), ECO10=Econazole (10 µg), ECO 50=Econazole (50 µg),

ITC=Itraconazol (50 µg), FC=Flucytosine (1 µg), KTC=Ketoconazole (10 µg), GRS=Griseofulvin (10 µg), MCZ=Miconazole (10 µg)





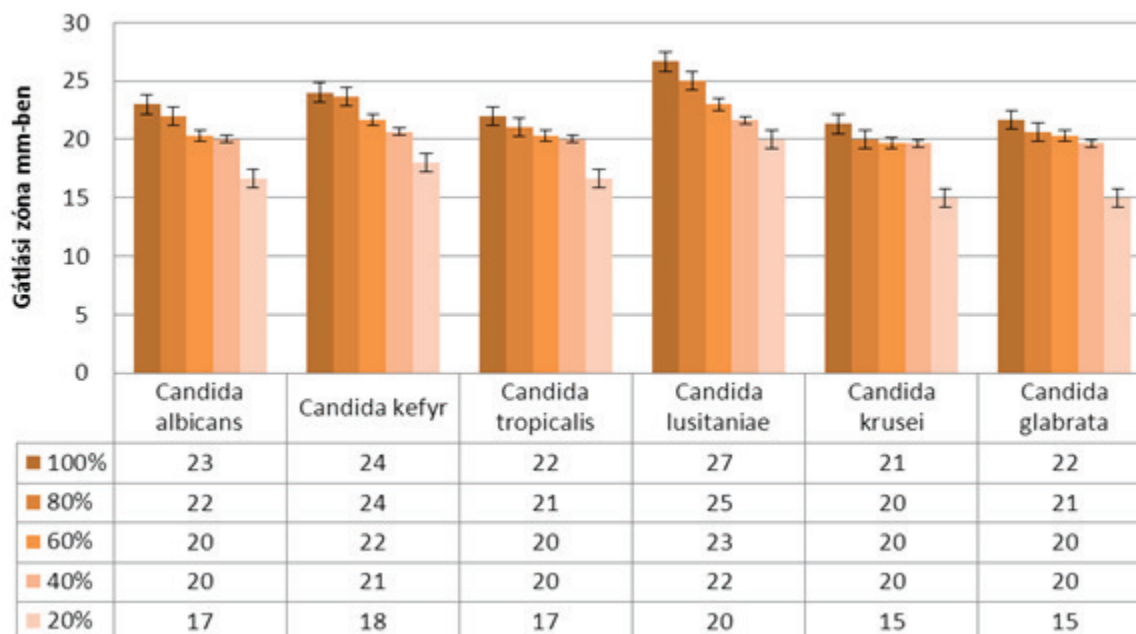
**2. ábra:** *Candida krusei* antimikotikum érzékenységének meghatározása papír-korongos technikával

**Fig 2:** Determination of *Candida krusei* antimycotic sensitivity by paper-disc technology

Az adatok elemzését (leíró statisztikai vizsgálat, egy szempontos varianciaanalízis) IBM SPSS Statistics 20.0 programmal végeztük.

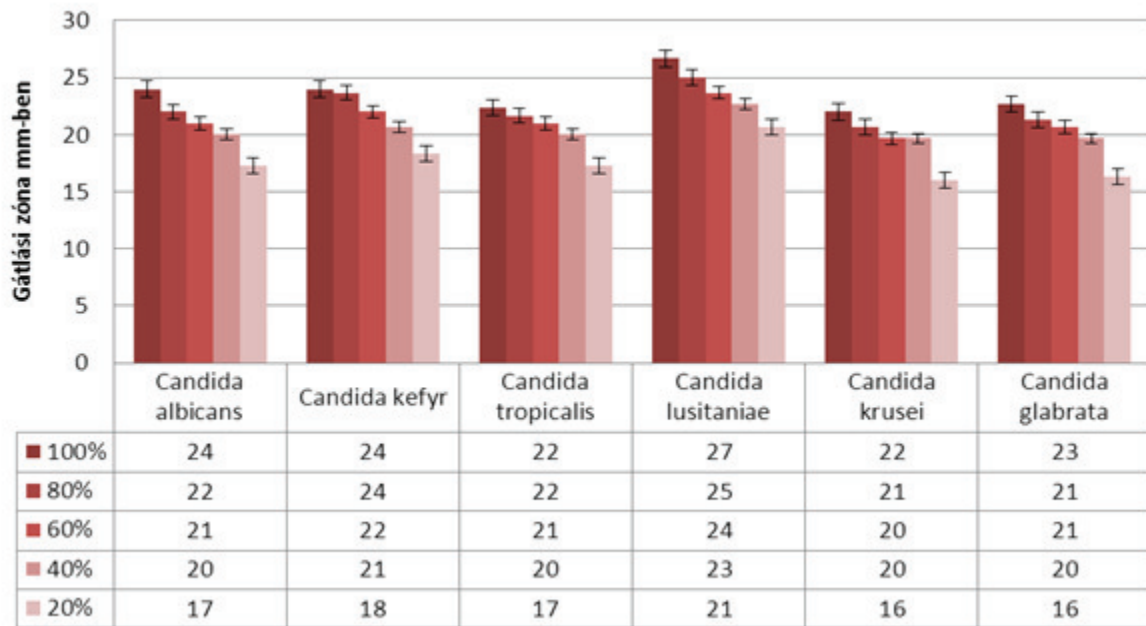
### Eredmények

A tesztelésben szereplő lemezek értékelését 24 óra elteltével vizsgáltuk először, majd mértük a furatok körüli feltisztulási zónák nagyságát mm-ben. A lemezeket további inkubálási céllal termosztátban tartottuk és 48-96h múlva megismételtük méréseinket. Az első 24h mérési eredmények átlagát a 3. ábra szemlélteti.



**3. ábra:** *Xenorhabdus budapestensis* (PF) gombaellenes hatása 24h-s átlag eredmények

**Fig. 3:** The average 24h result of antifungal effect of *Xenorhabdus budapestensis* (PF)



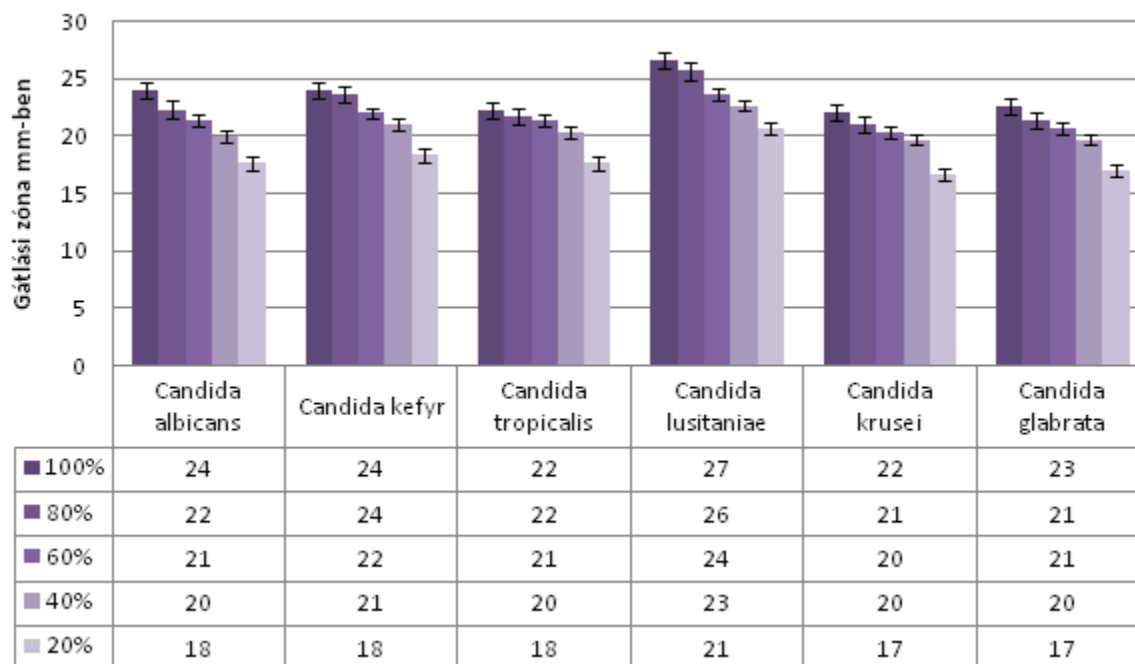
**4. ábra:** *Xenorhabdus budapestensis* (PF) gombaellenes hatása 48h-s átlag eredmény

**Fig.4:** The average 48h result of antifungal effect of *Xenorhabdus budapestensis* (PF)

A diagrammok *függőleges* tengelyén mért gátlási zónák nagysága látható mm-ben, a *vízszintes* tengelyen pedig a kutatásban tesztelt *Candida* fajok. Az eltérő színű oszlopok a különböző hígításokat jelölik. A 24 órás értékekhez képest egyes gombafajoknál a mért gátlási zónák átlagának kis mértékű növekedése figyelhető meg. A későbbi méréseknél, azonban változatlan maradt a zónák átmérői.

A 96 óra elteltével mért 3 párhuzamos gátlási zóna átlagai az *5.ábrán* láthatóak. Az gátlási zóna átmérőiben, ebben az esetben is megfigyelhető kismértékű növekedés bizonyos hígításokon, csökkenés viszont 96 óra után sem történt.





5. ábra: *Xenorhabdus budapestensis* (PF) gombaellenes hatása 96h-s átlag eredmény

Fig. 5: The average 96h result of antifungal effect of *Xenorhabdus budapestensis* (PF)

## Megbeszélés

A *X. budapestensis* általt szintetizált antimikrobiális fehérjék hatékonyságát teszteltük 6 különböző klinikai mintából izolált *Candida* fajon agar diffúziós módszerrel. A tisztított fehérjékben gazdag biopreparátum 5 különböző hígításával dolgoztunk kísérleteinkben. A 24 órás inkubálás után, mért gátlási zónák eredményeiből látható, hogy az általunk tesztelt fehérje igen hamar gombaellenes hatást fejtett ki a tesztelésben szereplő *Candida* fajokra. 100%-os hígításra minden tesztelt *Candida* species érzékenységet mutatott, mivel a gátlási zónák valamennyi esetben meghaladták a 20 mm-t. Legérzékenyebbnek a *C. lusitaniae*, legkevésbé érzékenynek a *C. krusei* bizonyult. Az érzékenység 80%-os hígítás esetén is igazolható, a gátlási zónák nagysága 20 mm felett volt mindegyik gomba esetén. 60% és 40% hígítás mellett kevésbé intenzíven, azonban még mindig érzékenységet mutattak a *Candida* fajok a tesztelt fehérjére.

Előzetes kutatásaink alapján a tesztelésben szereplő baktériumok esetében e hatás eléréséhez elegendő volt a biopreparátum 20%-os hígítása (14). A módszertani résznél említett hasonló vizsgálatban a *X. cabanillasi* által termelt fehérje, a „*cabanillasin*” a 24 órás mérést követően a *C. krusei* és *C. lusitaniae*-ra nagyobb gátlást fejtett ki, mint a *C. albicans* és *C. glabrata*-ra. 48 óra elteltével, azonban csökkent a *cabanillasin* aktivitása a tesztelt gombákra ezen kísérletekben (17).

Esetünkben minden tesztelésben szereplő faj kivétel nélkül érzékenységet mutatott. Egyes *Candida* fajok esetén 48 óra elteltével bizonyos hígításokon növekedés figyelhető meg

a gátlási zónák átmérőiben, számottevő csökkenés viszont egyik faj esetében sem mutatkozott. A 24 órás értékekhez hasonlóan a 100%, 80%, 60% és 40% hígítás mellett mértünk átlagosan 20 mm-nél nagyobb feltisztulási zónákat.

A gátlási zónák utolsó mérését 96 óra elteltével végeztük. Az eredményekből látható, hogy csökkenés a gátlási zónák átmérőjében nem történt egyik Candida faj esetében sem, tehát a preparátumban található fehérje feltételezhetően „fungicid” hatást ér el kísérleteinkben. A szárazanyag tartalom 0,19 µg/ml volt, ezért ezt az értéket tekintjük jelen kísérletekben a *Minimális Fungicid Koncentráció*-nak (MFC) mely a 40%-os hígított anyag hozott létre.

A különböző hígítások változó mértékben tartalmazták a tesztfehérjéket, tehát szárazanyagtartalmuk eltérő volt. A töményebb hígítások értelem szerűen több értékes, antimikrobiális hatású fehérjét tartalmaztak.

A kapott Candida törzsek antimikotikum érzékenysége és XAMP-érzékenysége között nem találtunk összefüggést. A *C. lusitaniae* meglehetősen magas antimikotikumokkal szembeni rezisztenciája ellenére, a legnagyobb érzékenységet mutatta a biopreparátumban található fehérjére.

Fontos volt tisztázni vizsgálatunkban, hogy az eltérő töménység és eltérő fehérjetartalom befolyásolja-e a kiváltott hatás erősséget. Ha igen akkor milyen mértékben. A hipotézis bizonyítására egyszempontos varianciaanalízist végeztünk 5%-os szignifikancia szinten.

A próba eredménye  $p < 0,001$ , így a null hipotézis, miszerint a kiváltott hatás függ a hígítás nagyságától, elfogadható. Tehát felvetésünk beigazolódott, azaz szignifikánsan nagyobb gátlási zónát mértünk a töményebb hígításokon, szignifikáns összefüggés van az antimikrobiális hatás és a biopreparátumból készített hígítás nagysága között.

### Következtetéseink

A *X. budapestensis* által szintetizált fehérjékre minden tesztelt Candida faj érzékenységet mutatott 40%-os hígításig. Az agardiffúziós kísérletünk során a kialakult gátlási zónák nagysága nem csökkent az idő múlásával sem. A biopreparátumban lévő fehérjéknek gombaölő „fungicid” hatást feltételezünk. A legnagyobb érzékenységet a *C. lusitaniae* mutatta, míg a legkisebbet a *C. krusei*. Eredményeink alátámasztották azokat a korábbi kísérleteket, melyben a *X. cabanillasi* antimikrobiális anyagára a *C. albicans* érzékenységet mutatott (17).

A gomba ellenes készítmények gyakori és nem szakszerű alkalmazása jelentős mértékben csökkenti a gombák érzékenységét az alkalmazott készítmények iránt. A rezisztencia mechanizmus okai között szerepel, hogy a sejtbe csökkent mennyiségben jut be a hatóanyag vagy onnan fokozott mértékben, ürül ki az efflux-pumpákon keresztül, esetleg a célmolekula,

módosul (24). Új hatás-mechanizmusú és eltérő hatóanyag tartalmú antifugális készítmények kifejlesztésére egyre nagyobb igény jelentkezik.

A *X. budapestensis* baktérium biopreparátumának Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokra kifejtett hatását szintén „cid” hatással értékeltük (baktericid) korábbi vizsgálatainkban. A Gram-pozitív baktériumok voltak az érzékenyebbek, de valamennyi tesztelésben szereplő baktérium a tesztelt anyag 20%-os hígítására érzékenységet mutatott (14).

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetünket szeretnénk kifejezni Dr *Kristóf Katalin* egyetemi docens asszonynak, aki biztosította számunkra az identifikált *Candida* fajokat, valamint Dr *Fodor András*nak, Széchenyi professzornak, aki megismertetett a *Xenorhabdus* baktériumokkal.

**Rövidítések:** Bica=bicornutin-A gén;CFCM= Cell-Free-Conditioned-Media,[sejtment esfermentlé]; HCL= hidrogén-klorid;LB=Luria-Bertani liquid,[tápleves folyadék];MALDI=Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, [mátrix lézer deszorpciós ionizáció];MeOH=metil-alkohol; MFC=MinimalFungicidKoncentráció,[minimális fungicid koncentráció]MH= Müller-Hinton gomba agar NH<sub>4</sub>OH=ammónium-hidroxid; PF=Purified Fraction,[tisztított bio-preparátum frakció]; pH=pondúsHi drogeinhi drogeinon kitevő;SD=Saboraud-dextróz agar; XAMP=Xenorhabdus Anti mikrobiális Peptid, [Xenorhabdus mikrobaellenes fehérje]

## IRODALOM

## REFERENCES

57. Chen L. Y., Kuo S. Ch., Wu H.S., et al.: Associated clinical characteristics of patients with candidemia among different *Candida* species. *J. Microbiol Immunol Infect* 2013. 46(6).463-468.
58. Pál, T.: Az orvosi mikrobiológia tankönyve. Medicina Könyvkiadó, Budapest Zrt. 2012.
59. Mayer F. L., Wilson D., Hube B.: *Candida albicans* pathogenicity mechanism. *Virulence* 2013. 15. 4(2).119-128.
60. Bolotin-Fukuhara, M., Fairhead C et al.: *Candida glabrata*, the other yeast pathogen. *FEMS Yeast Res.* 2016. 16(2).
61. Gabaldón T., Carraté L.: The birth of a deadly yeast: tracing the evolutionary emergence of virulence traits in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 2016, 16(6).
62. Negri M., Silva S., Henriques M., et al.: Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. *Eur J. Clin. Microbiol Infect Dis* 2012. 31 (7) 1399-1412.
63. Zhang H., Ran Y., Li D., et al.: *Clavispora lusitaniae* and *Chaetomium atr brunneum* as rare agents of cutaneous infection. *Mycopathologia*,2010. 169(5)373-380.
64. Peyron F., Favel A., Calaf A., et al.: Sterol and Fatty Acid Composition of *Candida lusitaniae* clinical isolates. *Antimicrob. Agents and Chemother*2002. 46(2). 531-533.
65. Dufresne S.F., Marr K.A., Sydnor E., et al.: Epidemiology of *Candida kefyr* in patients with hematologic malignancies. *J.of Clin. Microbiol*2014. 52 (6).1830-1837.
66. Staab J.F., Neofytos D., Rhee P., et al.: Target enzyme mutations confer differential echinocandin susceptibilities in *Candida kefyr*. *Antimicrob Agents and Chemother.*2014. 58(9).5421-5427.

67. Kaufmann C.A., Marr K.A., Thorner A.R.: Treatment of candidemia and invasive candidiasis in adults In: UpToDate, 2016. 03.13. <http://www.uptodate.com/contents/treatment-of-candidemia-and-invasive-candidiasis-in-adults>
68. Amaral-Lopes S., Moura A.: Neonatal fungal sepsis by *Candida krusei*: A report of three cases and a literature review. *Med Mycol Case Rep* 2012. 16 (1). 24–26.
69. Böszörményi E.: Entomopathogen bacterium antibiotic activity and symbiotic capacity of gnotobiological analyses. Ph.,D. Thesis, Eötvös University, Budapest 2010. 10-40.
70. Böszörményi E., Barcs I., Domján Gy., et al.: *Xenorhabdus budapestensis* entomopathogenic bacteriacell free conditioned medium and purified peptide fraction effect on some zoonotic bacteria. *Orv. Hetil.* 2015. 156 (44). 1782–1786.
71. Böszörményi E., Vozik D., Hevesi M., et al.: Entomopathogenic nematode-symbiotic bacteria antimicrobial peptides effect poly and multidrug resistant pathogens bacteria. [Entomogatógén nematoda-szimbionta baktériumok antimikrobiális peptidjeinek hatása antibiotikumokkal szembeni poli és multirezisztens baktériumokra] *Georgicon For Agriculture: A Multidisciplinary J in Agricult Sciences*, 2013. 16 (1). 85-90.
72. Furgani G., Böszörményi E., Fodor A., et al.: *Xenorhabdus* antibiotics: a comparative analysis and potential utility for controlling mastitis caused by bacteria. *J. of Appl Microbiol* 2008. 104(3):745–758.
73. Houard J., Aumelas A., Noel T., et al.: Cabanillasin a new antifungal metabolite, produced by entomopathogenic *Xenorhabdus cabanillasi* JM26. *J. Antibiot (Tokyo)* 2013. 66 (10). 617-620.
74. Böszörményi E., Érsek T., Fodor A., et al.: Isolation and activity of *Xenorhabdus* antimicrobial compounds against the plant pathogens *Erwinia amylovora* and *Phytophthora nicotianae*. *J. Appl. Microbiol.*, 2009. 107(3):746-759.
75. Fuchs S.W., Grundmann F., Kurz M., et al.: Fabclavines: bioactive peptide-polyketide-polyamino hybrids from *Xenorhabdus*. *Chem Bio Chem*, 2014. 15 (4):512-516.
76. Lengyel K., Lang E., Fodor A., et al.: Description of four novel species of *Xenorhabdus*, family Enterobacteriaceae: *Xenorhabdus budapestensis* sp. nov., *Xenorhabdus ehlersii* sp. nov., *Xenorhabdus innexi* sp. nov., and *Xenorhabdus szentirmaii* sp. nov., *Syst Appl Microbiol* 2005. 28 (2). 115-122.
77. Bonev B., Hooper J., Parisat J.: Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *J. Antimicrob. Chemother* 2008. 61 (6) 1295-1301.
78. CLSI Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. 17-18.
79. Susceptibility Testing of Yeasts 2011. <http://rosco.dk/gfx/yeasts.pdf>
80. Maubon D., Garnaud C., Calandra T., et al.: Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? *Intensive Care Med*, 2014. 40 (9). 1241-1255