Indiai szemfertőzésekből származó *Aspergillus* izolátumok molekuláris azonosítása és széleskörű jellemzése

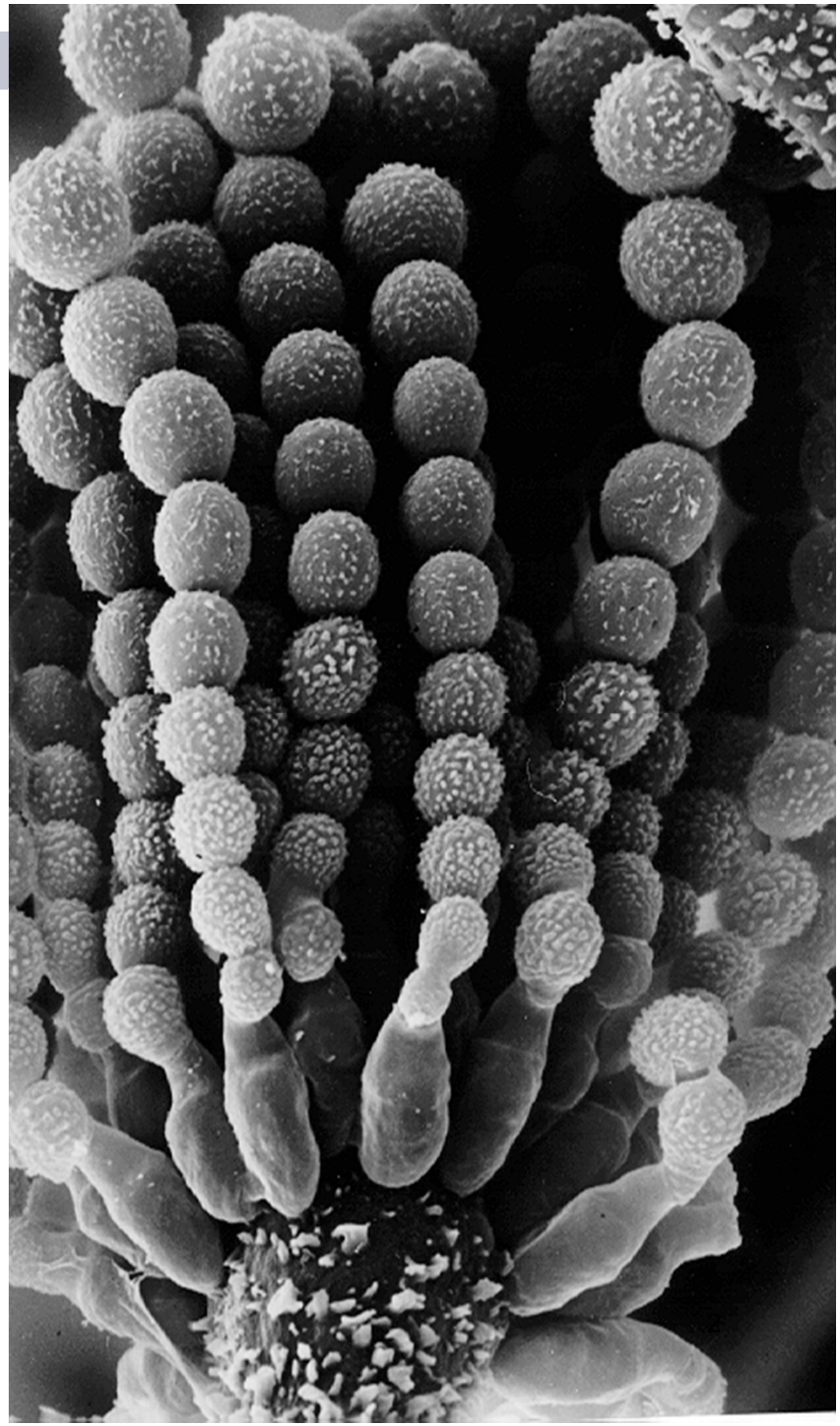
BARANYI Nikolett[1], SAMU Aliz[1], KOCSUBÉ Sándor[1], SZEKERES András[1], KREDICS László[1], Palanisamy MANIKANDAN[2], VARGA János[1]

1 Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Mikrobiológia Tanszék, 6726 Szeged, Közép fasor 52

2 Aravind Eye Hospital and Postgraduate Institute of Ophthalmology, Coimbatore, Tamilnadu, India

Aspergillus

- Elterjedt nemzetség mintegy 300-350 fajjal
- Fajai jelentősek az élelmiszer- és biotechnológiai iparban, mint opportunista patogének és mint mikotoxin termelők
- Jelentőségét jelzi, hogy eddig több mint 20 faj genomját szekvenálták meg!
- Általában raktári penészként tartják számon (**postharvest kontamináció**)



Keratitisz

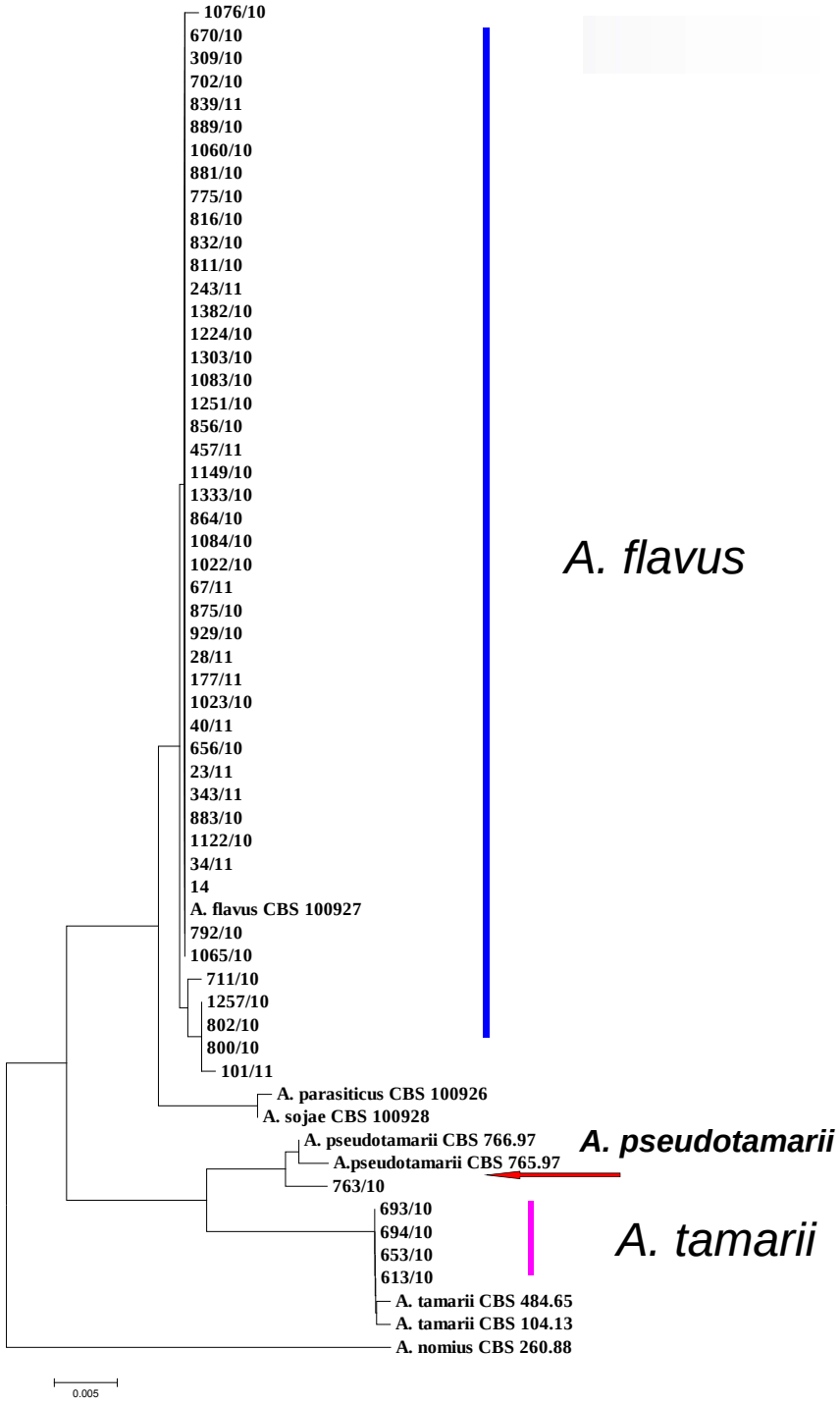
- A kornea gyulladásos folyamatai (baktérium, vírus, gomba)
- Keratomikózis: Leggyakrabban *Candida*, *Fusarium* és *Aspergillus* fajok az előidézői
- *Aspergillus* keratitisz leggyakoribb kórokozói: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus* és *A. niger*
- Ok: Szaruhártya sérülése, többnyire mezőgazdasági munka során

Célkitűzések

- 52 indiai szemfertőzésből származó, morfológiai vizsgálatok alapján az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójába sorolt izolátum fajszintű azonosítása
- A párosodási típus gének (MAT) eloszlásának vizsgálata az izolátumokban
- Aflatoxin termelő képesség vizsgálata
- Gombaellenes szerekkel szembeni érzékenység vizsgálata

Fajazonosítás

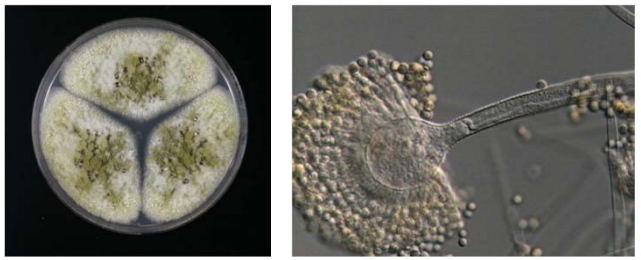
- Az izolátumok fajszintű azonosítása részleges kalmodulin szekvenciáik alapján történt
- *A. flavus* (46), *A. tamarii* (4), *A. terreus* (1), ***A. pseudotamarii*** **(1)**
- A törzsfa készítés (493 nukleotidnyi DNS szakaszok, neighbor-joining módszer)



Fajazonosítás eredménye

A. flavus

- Változatos elterjedésű
- Leggyakoribb aflatoxin termelő faj (B_1+B_2)
- Emberre és állatra egyaránt patogének lehetnek

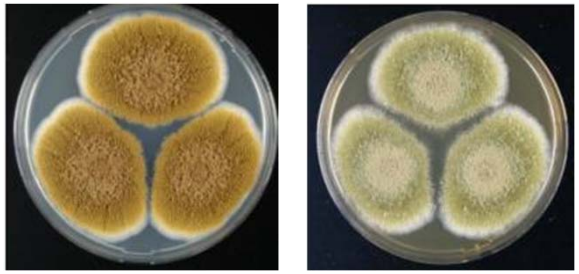


A. flavus telepmorfológiája CYA táptalajon és egy konídiumtartó mikroszkópos képe

A. tamarii

- Változatos elterjedésű
- Nem termel aflatoxinokat
- Keleti fermentációkban alkalmazzák

(A. terreus)



A. tamarii telepmorfológiája CYA és MEA táptalajon

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Oct. 2007, p. 3464–3467 Vol. 45, No. 10
0095-1137/07/$08.00+0 doi:10.1128/JCM.00920-07
Copyright © 2007, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

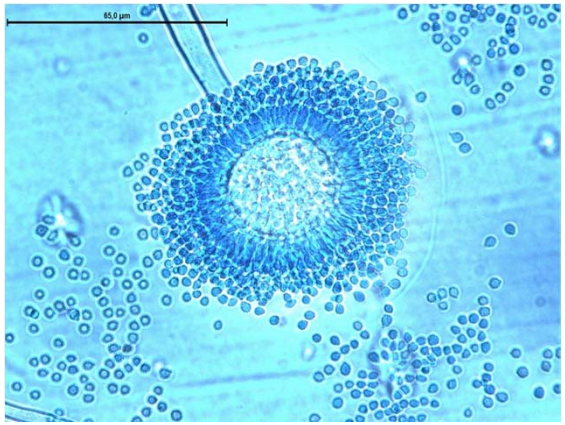
Case of Keratitis Caused by *Aspergillus tamarii*[▽]

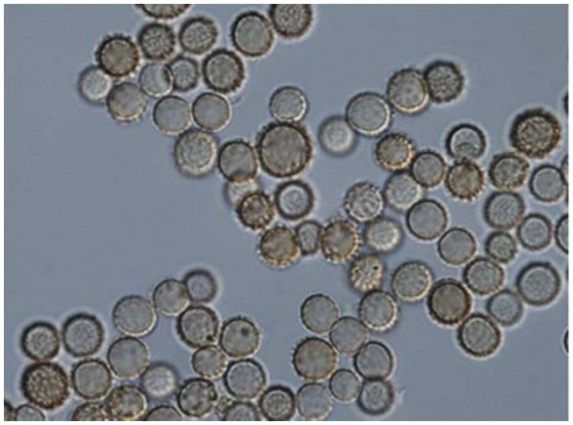
László Kredics,[1] János Varga,[1,2] Sándor Kocsubé,[1] Ilona Dóczi,[3] Robert A. Samson,[2] Revathi Rajaraman,[4] Venkatapathy Narendran,[4] Madhavan Bhaskar,[5] Csaba Vágvölgyi,[1] and Palanisamy Manikandan[4]*

Department of Microbiology, Faculty of Sciences, University of Szeged, Szeged, Hungary[1]; CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands[2]; Department of Clinical Microbiology and Diagnostics, Faculty of Medicine, University of Szeged, Szeged, Hungary[3]; Aravind Eye Hospital and Postgraduate Institute of Ophthalmology, Coimbatore, India[4]; and Department of Microbiology, Coimbatore Medical College, Coimbatore, India[5]

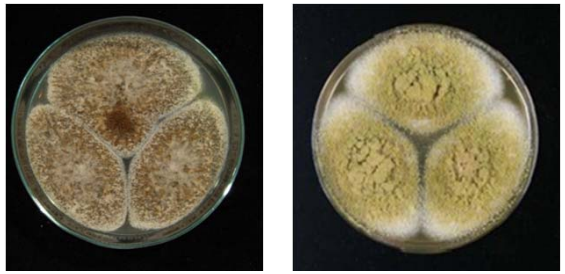
A. pseudotamarii

- Elsőként azonosítottuk, mint opportunista humán patogént
- 2001-ben írták le, mint aflatoxin termelő fajt (Ito és mtsi)
- Aflatoxin B_1+B_2 termelő
- Előfordulás: Japán, Argentína, Brazília, **India**





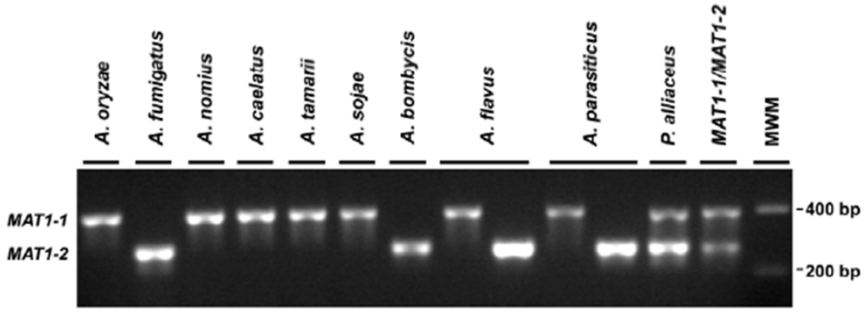
A. pseudotamarii konídiumtartó és a konídiumok mikroszkópos képe



Az *Aspergillus pseudotamarii* telepmorfológiája MEA táptalajon (balra) és CYA táptalajon (jobbra)

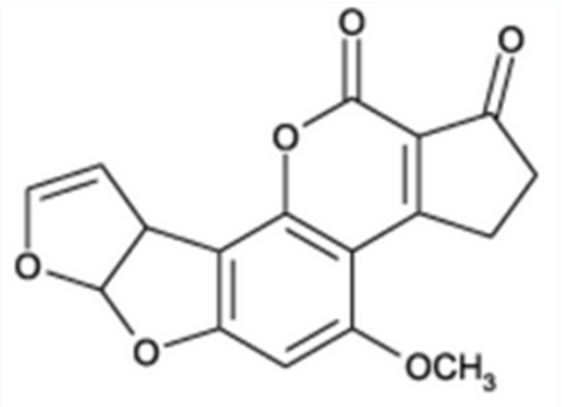
Az izolátumok párosodási típus génjeinek vizsgálata

- Specifikus primerpárokkal végzett PCR reakcióval végeztük el
- MAT1-1 primerpárral 396 bp méretű fragmentet vártunk, míg MAT1-2 primerpárral 270 bp méretűt
- Valamennyi általunk vizsgált izolátum a MAT1-1 idiomorfot hordozta



A párosodási típus gének előfordulása különböző *Aspergillus* törzsekben (Ramirez-Prado és mtsi 2008)

Aflatoxinok

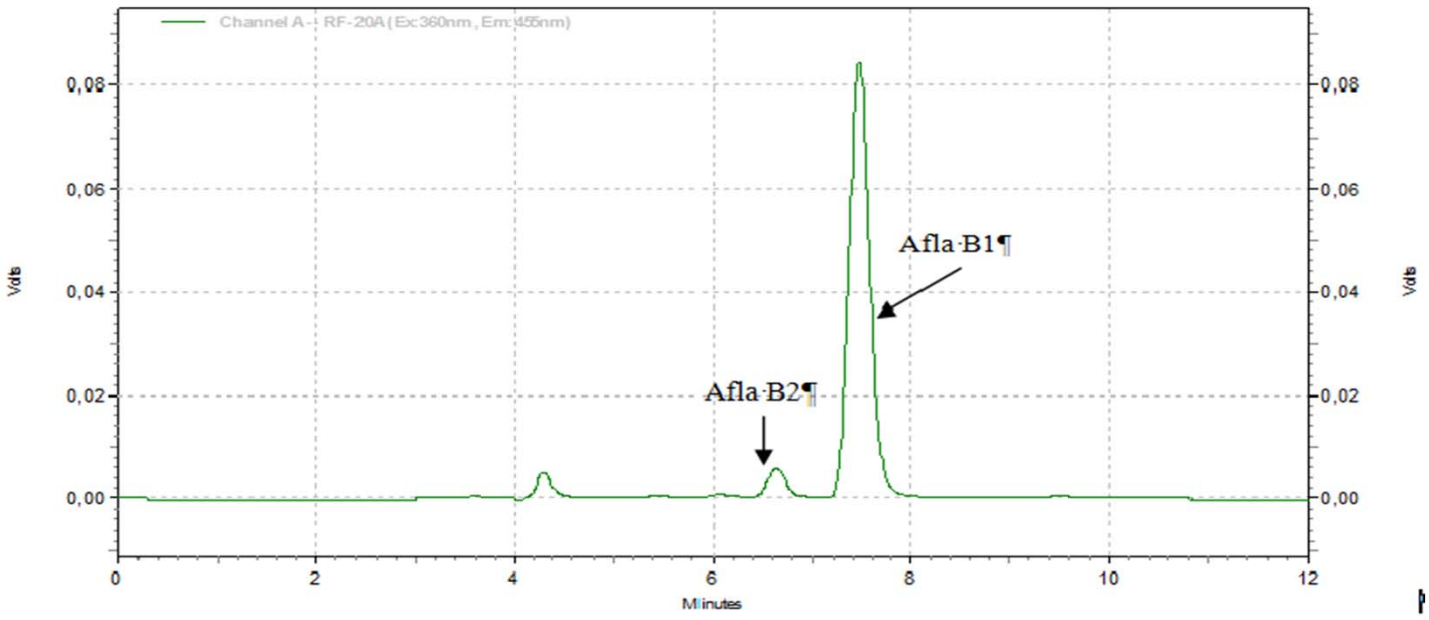


- Dekaketid kumarin származékok
- Az IARC az aflatoxin B1-et az elsőszámú karcinogének csoportjába sorolta (1982)
- Az aflatoxin B_1 hepatotoxikus és hepatokarcinogén hatású, akut esetben toxikus hepatitiszt idéz elő
- Legfontosabb termelők: *A. flavus* (B), *A. parasiticus* (B&G), *A. nomius* (B&G)
- Aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2, M_1, M_2
- Előfordulás: földimogyoró, gyapot, kukorica, búza, stb.

Aflatoxin termelő képesség

- Az izolátumok aflatoxin termelő képességét YES tápoldatban vizsgáltuk
- *A. pseudotamarii* (BHI, RPMI 35°C)
- Az *A. flavus* izolátumok 50%-a bizonyult aflatoxin termelőnek TLC analízis alapján
- Az *A. flavus* izolátumok 0.1-150 μg/ml közötti mennyiségben termeltek aflatoxin B_1-et, és 0.05-5 μg/ml mennyiségben aflatoxin B_2-t HPLC analízisük alapján

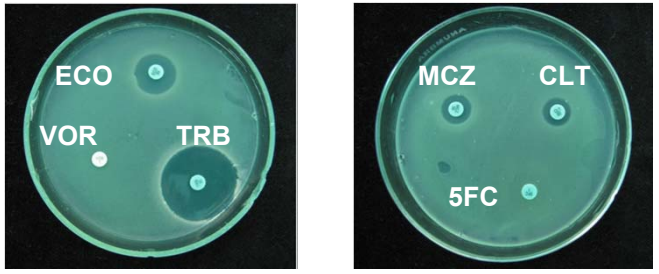
Az *A. pseudotamarii* izolátum által YES tápoldaton termelt aflatoxinok HPLC kromatogramja



Az izolátum 1 μg/ml aflatoxin B_1-et, és 0.0026 μg/ml aflatoxin B_2-t termelt

Antifungális érzékenység vizsgálata

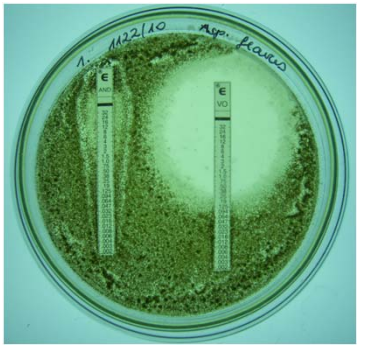
- Korongdiffúziós teszt
- 6 gombaellenes szer (Mikonazol, Terbinafin, Voriconazol, Clotrimazol, Econazol, Flucitozin) (BioLab)
- Eredmény: Flucitozinnal szemben a vizsgált izolátumok 100%-a érzéketlennek bizonyult
- Terbinafinnal szemben a legérzékenyebbek
- Az izolátumok 47%-a bizonyult érzékenynek Vorikonazollal szemben



Az *Aspergillus pseudotamarii* gombaellenes szerekkel szembeni érzékenysége 48 órás inkubáció után
A z ábrán szereplő jelölések: MCZ (mikonazol), TRB (terbinafin), VOR (vorikonazol), CLT (klotrimazol), ECO (ekonazol), 5 FC (flucitozin vagy 5- fluorocitozin

Antifungális érzékenység vizsgálata

- E-teszt
- 8 gombaellenes szer: Anidulafungin, **Amphotericin B**, Micafungin, **Itrakonazol**, Flukonazol, Caspofungin, **Posaconazol** és **Voriconazol** (bioMérieux)
- Eredmény: Flukonazollal szemben az izolátumok 100%-a érzéketlennek bizonyult
- Hatásos: **Amphotericin B**, **Itrakonazol**, **Posaconazol** és **Voriconazol**
- Anidulafungin, Micafungin és Caspofungin esetében a gátlási zónán belül mikrokolóniák jelentek meg



A. flavus izolátum gombaellenes szerekkel szembeni érzékenysége 48 órás inkubáció után

A z ábrán szereplő jelölések: AND (Anidulafungin), VOR (Vorikolnazol)

További indiai izolátumok

- *A. fumigatus(9), A. niger(2), A. terreus(3)*
- *A. lentulus(2)* (Indiában elsőként mutattuk ki, mint keratitiszt előidéző fajt)
- *A. eucalypticola(3), A. neoniger(1)* (elsőként azonosítottuk, mint humán patogén fajt)

A klímaváltozás következménye

Összefoglalás

- A vizsgált izolátumok közül 46 az *A. flavus*, 4 az *A. tamarii,* míg 1-1 izolátum az *A. terreus* és *A. pseudotamarii* fajba tartoztak
- Az *A. pseudotamarii*-t elsőként sikerült azonosítanunk, mint humán patogén szervezetet
- Valamennyi *A. flavus, A. tamarii* és az *A. pseudotamarii* izolátum a MAT1-1 idiomorfot hordozta
- Az *A. flavus* izolátumok egy része és az *A. pseudotamarii* izolátum termelt mind aflatoxin B_1-et, mind B_2-t YES tápoldatban
- Antifungális szerekkel szembeni érzékenység vizsgálata során hatásosnak bizonyultak: Itrakonazol, Mikonazol, Voriconazol, Clotrimazol, Econazol, Posaconazol, Terbinafin és Amphotericin B

Köszönetnyilvánítás

- Prof. Vágvölgyi Csaba
- Bencsik Ottó
- Szigeti Gyöngyi
- Szegedi Tudományegyetem TTIK Mikrobiológia Tanszék
- Aravind Eye Hospital and Postgraduate Institute of Ophthalmology

UNIVERSITAS SCIENTIARUM SZEGEDIENSIS · SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM · 1921 · VERITAS · VIRTUS · LIBERTAS

ÚJ SZÉCHENYI TERV

MAGYARORSZÁG MEGÚJUL

A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

- A kutatási munkát „Az SZTE Kutatóegyetemi Kiválósági Központ tudásbázisának kiszélesítése és hosszú távú szakmai fenntarthatóságának megalapozása a kiváló tudományos utánpótlás biztosításával” című, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012 azonosítószámú projekt támogatja. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Köszönöm a figyelmet!