

**SZARUHÁRTYA-FERTŐZÉSEKBŐL IZOLÁLT *FUSARIUM* TÖRZSEK  
ÁTFOGÓ VIZSGÁLATA**

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS**

**HOMA MÓNIKA**

**TÉMAVEZETŐK:**

**DR. GALGÓCZI LÁSZLÓ**  
TUDOMÁNYOS MUNKATÁRS

**DR. KREDICS LÁSZLÓ**  
EGYETEMI DOCENS



**BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR  
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK**

**SZEGED**

**2016**

## TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK.....	4
2. BEVEZETÉS.....	6
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
3.1. A <i>Fusarium</i> nemzetség jellemzése .....	8
3.2. A <i>Fusarium</i> nemzetség klinikai jelentősége.....	11
3.2.1. <i>Fusarium</i> keratitisz .....	15
3.2.1.1. A <i>Fusarium</i> keratitisz diagnosztizálása és a kórokozó azonosítása .....	16
3.2.1.2. A <i>Fusarium</i> keratitisz kezelésének lehetőségei napjainkban .....	19
3.3. A kísérletek során alkalmazott illóolajok antifungális hatása.....	22
3.4. Az extracelluláris enzimek, mint a <i>Fusarium</i> keratitisz kialakításában szerepet játszó potenciális virulenciafaktorok .....	24
4. CÉLKITŰZÉSEK .....	27
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....	29
5.1. A kísérletekben szereplő gombatörzsek: izolálás, tenyésztés, fenntartás .....	29
5.2. Alkalmazott tápközegek, pufferek, oldatok és reagensek .....	30
5.3. Alkalmazott antifungális szerek .....	31
5.4. Alkalmazott illóolajok, illóolaj-komponensek .....	32
5.5. Módszerek .....	34
5.5.1. <i>Fusarium</i> izolátumok azonosítása molekuláris módszerekkel.....	34
5.5.1.1. Szekvenciaalapú azonosítás .....	34
5.5.1.2. <i>Fusarium solani</i> fajkomplexumhoz tartozó törzsek specifikus, PCR-alapú azonosítása .....	35
5.5.1.3. A <i>TEF1</i> szekvencia hasítása <i>EcoRI</i> restrikciós endonukleázzal .....	36
5.5.2. Klinikai <i>Fusarium</i> izolátumok filogenetikai analízise .....	36
5.5.3. Antifungális szerek iránti érzékenység vizsgálata .....	37
5.5.3.1. Antimikrobiális tesztek mikrodilúcióval .....	37
5.5.3.2. Hatóanyag-kombinációk iránti érzékenység vizsgálata.....	38
5.5.4. Klinikai <i>Fusarium</i> izolátumok illóolajok iránti érzékenységének vizsgálata ..	38
5.5.4.1. Antimikrobiális tesztek mikrodilúcióval .....	38
5.5.4.2. Illóolaj-komponens - antifungális szer kombinációk <i>in vitro</i> növekedésgátló hatásának vizsgálata .....	39
5.5.4.3. Illóolajok okozta morfológiai változások mikroszkópos vizsgálata.....	39

5.5.5. Extracelluláris enzimaktivitás-tesztek .....	41
5.5.6. Statisztikai analízis.....	42
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	43
6.1. <i>Fusarium</i> izolátumok azonosítása molekuláris módszerekkel .....	43
6.1.1. Szekvenciaalapú azonosítás.....	43
6.1.2. <i>Fusarium solani</i> fajkomplexumhoz tartozó törzsek specifikus, PCR-alapú azonosítása .....	46
6.1.3. Új módszer a <i>Fusarium solani</i> fajkomplexum képviselőinek azonosítására: a <i>TEF1</i> szekvencia hasítása <i>EcoRI</i> restrikciós endonukleázzal .....	47
6.1.4. <i>Fusarium solani</i> fajkomplexumhoz tartozó törzsek izolálása indiai klinikai és környezeti mintákból.....	49
6.2. Klinikai <i>Fusarium</i> izolátumok filogenetikai analízise .....	49
6.3. Klinikai <i>Fusarium</i> izolátumok antifungális szerek iránti érzékenységének vizsgálata .....	51
6.3.1. Antifungális szerek iránti érzékenység vizsgálata mikrodilúcióval .....	51
6.3.2. Hatóanyag-kombinációk iránti érzékenység vizsgálata .....	53
6.4. Illóolajok antifungális hatásának vizsgálata .....	55
6.4.1. Antimikrobiális tesztek mikrodilúcióval.....	55
6.4.2. Illóolaj-komponens - antifungális szer kombinációk <i>in vitro</i> növekedésgátló hatása .....	58
6.4.3. Illóolajok okozta morfológiai változások mikroszkópos vizsgálata .....	60
6.5. <i>Fusarium solani</i> fajkomplexumhoz tartozó izolátumok extracelluláris enzim termelésének vizsgálata.....	64
7. ÖSSZEFOGLALÁS .....	69
8. SUMMARY.....	73
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	77
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	92
11. MELLÉKLETEK.....	94

## 1. RÖVIDÍTÉSJEJYZÉK

<b>AMB:</b>	amfotericin B
<b>BPP:</b>	<i>Bayesian posterior probability</i> , Bayes-féle poszterior valószínűség
<b>BLAST:</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>CBS:</b>	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i> , Utrecht, Hollandia
<b>CLT:</b>	klotrimazol
<b>DRBCA:</b>	<i>dichloran rose bengal chloramphenicol agar</i> , diklorán-bengálvörös-kloramfenikol agar
<b>EAI:</b>	enzim aktivitási index
<b>ECN:</b>	ekonazol
<b>FCOSC:</b>	<i>Fusarium concolor species complex</i> , <i>Fusarium concolor</i> fajkomplexum
<b>FDSC:</b>	<i>Fusarium dimerum species complex</i> , <i>Fusarium dimerum</i> fajkomplexum
<b>FFSC:</b>	<i>Fusarium fujikuroi species complex</i> , <i>Fusarium fujikuroi</i> fajkomplexum
<b>FICI:</b>	<i>fractional inhibitory concentration index</i> , frakcionális gátló koncentráció index
<b>FIESC:</b>	<i>Fusarium incarnatum-equiseti species complex</i> , <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> fajkomplexum
<b>FLSC:</b>	<i>Fusarium lateritium species complex</i> , <i>Fusarium lateritium</i> fajkomplexum
<b>FOSC:</b>	<i>Fusarium oxysporum species complex</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> fajkomplexum
<b>FSAMSC:</b>	<i>Fusarium sambucinum species complex</i> , <i>Fusarium sambucinum</i> fajkomplexum
<b>FSSC:</b>	<i>Fusarium solani species complex</i> , <i>Fusarium solani</i> fajkomplexum
<b>FVSC:</b>	<i>Fusarium. ventricosum species complex</i> , <i>Fusarium ventricosum</i> fajkomplexum
<b>GC-MS:</b>	<i>Gas Chromatography-Mass Spectroscopy</i> , gázkromatográfiás elválasztással kombinált tömegspektrometria
<b>IGS:</b>	<i>intergenic spacer</i> , gének közötti elválasztó régió
<b>ITC:</b>	itrakonazol
<b>ITS:</b>	<i>internal transcribed spacer</i> , köztes átíródó elválasztó régió
<b>LS:</b>	<i>lineage-specific region</i> , leszármazás-specifikus régió

<b>MIC:</b>	<i>minimal inhibitory concentration</i> , minimális gátló koncentráció
<b>MLBS:</b>	<i>Maximum Likelihood bootstrap</i>
<b>MLST:</b>	<i>multilocus sequence typing</i> , multilókusz szekvencia-tipizálás
<b>MM:</b>	<i>minimal medium</i> , minimál tápoldat
<b>MTCC:</b>	<i>The Microbial Type Culture Collection and Gene Bank</i> , Chandigarh, India
<b>NCBI:</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NRRL:</b>	<i>Northern Regional Research Laboratory, Agricultural Research Service Culture Collection (ARSCC), National Center for Agricultural Utilization Research (NCAUR)</i> , Peoria, USA
<b>NTM:</b>	natamicin
<b>PCR:</b>	<i>polymerase chain reaction</i> , polimeráz láncreakció
<b>PDA:</b>	<i>potato dextrose agar</i> , burgonya-dextróz agar
<b>PDB:</b>	<i>potato dextrose broth</i> , burgonya-dextróz tápoldat
<b>PI:</b>	propídiium-jodid
<b>RLB:</b>	<i>Reverse line blot</i>
<b>RPB1:</b>	<i>RNA polymerase II largest subunit</i> , az RNS polimeráz II legnagyobb alegysége
<b>RPB2:</b>	<i>RNA polymerase II second largest subunit</i> , az RNS polimeráz II második legnagyobb alegysége
<b>SZMC:</b>	<i>Szeged Microbiological Collection</i> , Szeged, Magyarország
<b>TAE:</b>	Tris-ecetsav-dinátrium-EDTA
<b>TEF1:</b>	transzlációs elongációs faktor 1 $\alpha$
<b>TFK:</b>	terminális <i>Fusarium</i> klád
<b>TRB:</b>	terbinafin
<b>TUB:</b>	$\beta$ -tubulin
<b>VRC:</b>	vorikonazol

## 2. BEVEZETÉS

Az élesztő- vagy fonalgombák által okozott humán szaruhártya-gyulladás (keratomikózis) komoly egészségügyi problémát jelent a trópusi és szubtrópusi területek fejlődő országaiban, Dél-Indiában a látáskárosodás és vakság vezető okai között tartják számon (Bharathi és mtsai. 2003, Srinivasan 2004). Mindez megelőzhető lenne a fertőzés időben történő felismerésével, a gyors és pontos diagnózis felállításával, valamint a megfelelő és hatékony antifungális terápia alkalmazásával. A keratomikózis a mezőgazdaságban foglalkoztatott középkorú férfi lakosság körében a leggyakoribb; az esetek többségében kialakulását a szem, illetve a szaruhártya növényi vagy állati eredetű ágensek által okozott sérülése előzi meg (Bharathi és mtsai. 2007).

A *Fusarium* nemzetség képviselői Észak- és Kelet-Indiában a második, míg az ország déli és nyugati területein az első helyen állnak a keratomikózisból leggyakrabban izolált kórokozók között (Bharathi és mtsai. 2007, Chander és mtsai. 2008, Rautaraya és mtsai. 2011, Deorukhkar és mtsai. 2012). Az esetek túnyomó többségéért a *Fusarium solani* fajkomplexum (*F. solani species complex*, FSSC) tagjai felelősek (Chakrabarti és Singh 2011), de ritkábban a *Fusarium oxysporum* (*F. oxysporum species complex*, FO SC), *Fusarium fujikuroi* (*F. fujikuroi species complex*, FFSC), *Fusarium dimerum* (*F. dimerum species complex*, FDSC) és *Fusarium incarnatum-equiseti* (*F. incarnatum-equiseti species complex*, FIESC) fajkomplexumok képviselőit is izolálják humán keratitiszből (van Diepeningen és mtsai. 2014, Hassan és mtsai. 2016). A *Fusarium*-ok antifungális szerek iránti érzékenysége fajkomplexumonként eltérő lehet (van Diepeningen és de Hoog 2016), és gyakran rezisztenciát mutatnak a konvencionális antifungális szerekkel szemben (Tortorano és mtsai. 2014). Ezért a klinikai gyakorlatban általánosan alkalmazott morfológiai azonosítási módszerek helyett - amelyek segítségével sok esetben csak nemzetségszinten azonosíthatók a megbetegedést okozó mikroorganizmusok - kiemelten fontos a kórokozók faj-, de legalább fajkomplexum-szintű azonosítása. A pontatlan határozás és az abból következő nem célzott terápia megnyújthatja a kezelés idejét, fokozva a rezisztencia kialakulásának esélyét és a mellékhatások kialakulásának kockázatát. Mindez a betegség súlyosbodásához és akár látásvesztéshez is vezethet. Ugyanakkor, egy megbízható, gyors és alacsony költségigényű fajkomplexum- vagy fajsintű azonosítási módszer hatékonyabbá teheti a *Fusarium* keratitisz gyógyítását a fejlődő országokban.

Mivel egy új, hatékonyabb kezelési mód kidolgozásához elengedhetetlen a kórokozó minél pontosabb ismerete, munkánk célja keratitiszből származó *Fusarium* izolátumok átfogó

vizsgálata volt. Ennek érdekében elvégeztük 70 klinikai izolátum molekuláris azonosítását és filogenetikai analízisét, valamint további 39 izolátum izolálását és azonosítását. Kidolgoztunk egy, az FSSC tagjaira specifikus, gyors, molekuláris biológiai azonosítási módszert. Meghatároztuk az egyes izolátumok antifungális szerek iránti *in vitro* érzékenységi profilját, vizsgáltuk az izolátumok illóolajok iránti *in vitro* érzékenységét és a leghatékonyabbnak bizonyuló illóolaj, illetve fő komponensének hatását mikroszkópos technikák segítségével. Teszteltük továbbá a natamicin (NTM) és terbinafin (TRB), valamint a NTM és fahéjaldehid kombinációjának *in vitro* hatékonyságát. Végezetül klinikai és környezeti FSSC izolátumok extracelluláris enzimaktivitását határoztuk meg és hasonlítottuk össze.

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1. A *Fusarium* nemzetség jellemzése

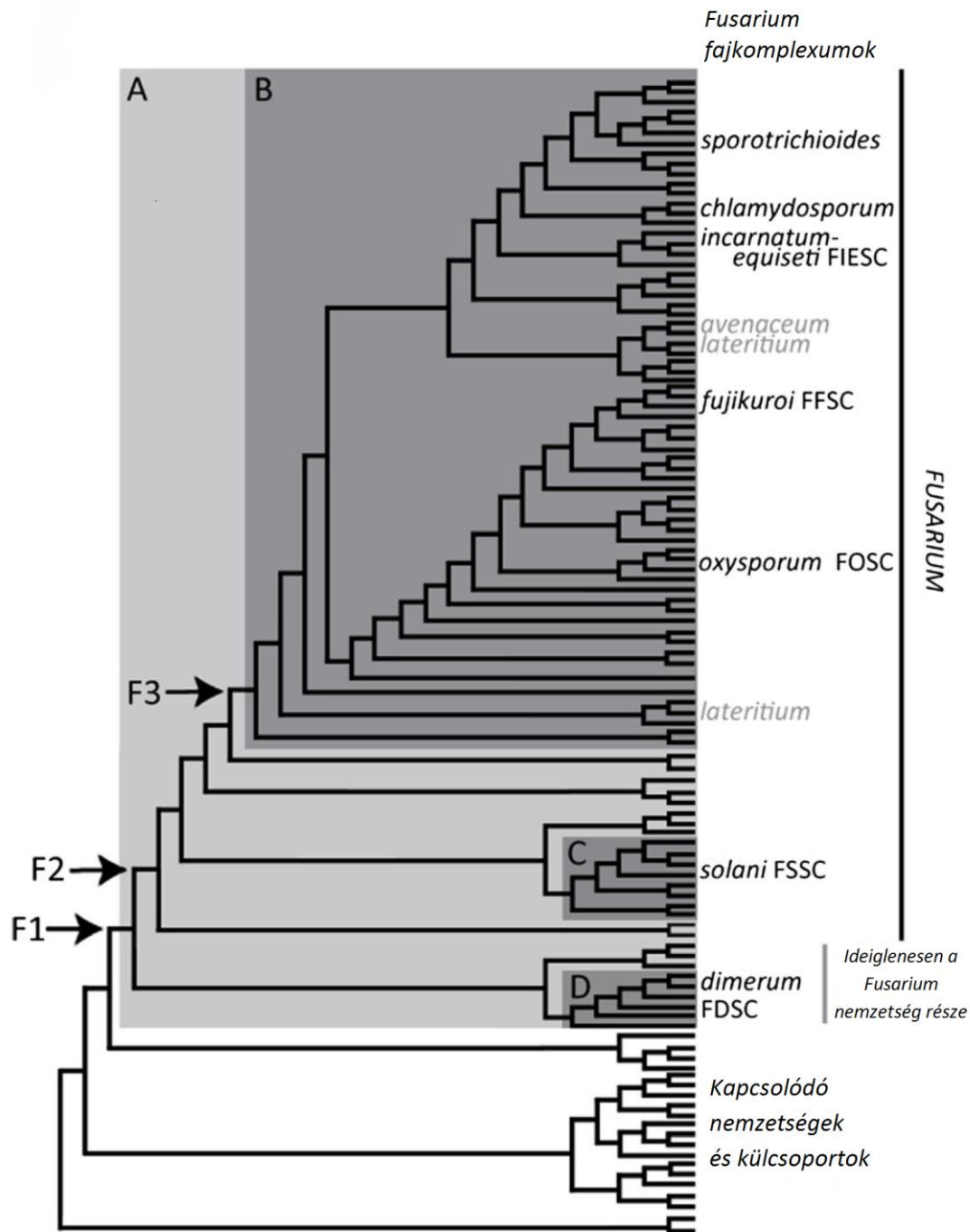
A mai *Fusarium* nemzetséget elsőként Link (1809) írta le *Fusisporium* néven, utalva az ide tartozó fajok jellegzetes orsó (latinul *fuscus*) alakú makrokonídiumaira. A nemzetség az Ascomycota törzs, Pezizomycotina altörzs, Sordariomycetes osztály, Hypocreomycetidae alosztály, Hypocreales rend, Nectriaceae családjába tartozik (Lombard és mtsai. 2015). A *Fusarium* fajok többsége rendelkezik ivaros (teleomorf) és ivartalan (anamorf) alakokkal. Széleskörben elterjedtek a Földön (Manikandan és mtsai. 2011). Képviselői elsősorban talajban élő szaprofiták, de emellett jelentős növénypatogének is: *Fusarium*-ok okozzák többek között a búza és árpa kalászfertőzését, a banán rothadását (Summerell és mtsai. 2010), a paradicsom ún. fuzáriumos hervadását, valamint gyökér- és törzsothadását (Huang és mtsai. 2011, Shanmugam és Kanoujia 2011), továbbá a szója "sudden death syndrome" nevű betegségét (Westphal és mtsai. 2008). Az FSSC önmagában több mint 100 növénynemzetség megbetegítésével hozható összefüggésbe (Coleman és mtsai. 2009). Ezenfelül, egy friss felmérés alapján a *Fusarium graminearum* és a *F. oxysporum* 4. és 5. helyen áll a gazdasági és tudományos szempontból tíz legfontosabbnak tartott növénypatogén gomba listáján (Dean és mtsai. 2012). Jelentős mezőgazdasági kártételük felismerése indította el a *Fusarium* taxonómia fejlődését, ugyanis a kórokozók minél pontosabb ismerete, leírása és rendszertani helyzete is elengedhetetlenül fontos a betegségekkel szembeni hatékony fellépés érdekében. A nemzetség első említése óta eltelt nagyjából két évszázad alatt a *Fusarium*-ok rendszertana folyamatos átalakuláson ment keresztül. Az első 100 év során közel 1000 *Fusarium* fajt írtak le, viszont ezek összehasonlító vizsgálatát és csoportosítását egészen 1935-ig nem végezték el. Ekkor jelent meg Wollenweber és Reinking (1935) „*Die Fusarien*” című munkája, amelyben morfológiai bélyegek alapján a nemzetséghez akkoriban sorolt fajok számát a már említett 1000-ról 65 fajra, 55 fajtára és 22 formára csökkentették, melyeket 16 szekcióba soroltak. Habár az ezt követő évtizedekben számos újabb elképzelés született a *Fusarium*-ok rendszerezésével kapcsolatban (Snyder és Hansen 1940, 1941 és 1945; Raillo 1950, Gordon 1952, Bilai 1955, Messiaen és Cassini 1968, Booth 1971, Matuo 1972, Joffe 1974, Gerlach és Nirenberg 1982, Nelson és mtsai. 1983), valamennyi Wollenweber és Reinking munkáján alapult (Nelson és mtsai. 1994). A molekuláris biológia előretörése és a legújabb módszerek mikrobiológiában történő meghonosodása a *Fusarium*-ok rendszertanába is jelentős változásokat hozott. Fény derült arra, hogy a szekciók szerveződésének alapjául szolgáló morfológiai karakterek nem mindegyike megbízható evolúciobiológiai szempontból (Moretti



2009), így napjainkban ezeket már csak a molekuláris fajazonosítási módszerek kiegészítéseként alkalmazzák. A *Fusarium* izolátumok legpontosabb azonosítását jelenleg a DNS szekvenciaalapú módszerek, ezen belül is a multilókuszos szekvencia-tipizálás (*multilocus sequence typing*, MLST) teszi lehetővé (van Diepeningen és mtsai. 2015). A legfrissebb molekuláris eredmények alapján a nemzetséghez közel 20 - Al-Hatmi és munkatársai (2016a) szerint 22 - fajkomplexum tartozik, melyeken belül több mint 200 - egyes források szerint megközelítőleg 300 - fajt különítenek el (O'Donnell és mtsai. 2013, 2015; Al-Hatmi és mtsai. 2016a).

Az Amszterdami Nyilatkozat (Hawksworth és mtsai. 2011) értelmében az anamorf és teleomorf alakokkal is rendelkező gombák 2013. január 1-jétől kezdődően csak egy közös néven illethetők. Arról, hogy az ivaros vagy ivartalan alak elnevezését alkalmazzák-e egy adott gomba nemzetségre, az azzal foglalkozó kutatócsoportok dönthetnek (Hawksworth 2011). Az új nevezéktan bevezetése több jelenleg is vitatott, alapvető kérdést vetett fel a nemzetséggel kapcsolatban: Pontosan mit is tekintünk *Fusarium*-nak? Meddig terjednek a nemzetség határai, illetve hol és milyen szempontok alapján húzhatóak meg ezek a határok?

A válaszhoz ismernünk kell a *Fusarium* nemzetség filogenetikai hátterét. O'Donnell és munkatársai (2013) az RNS polimeráz II legnagyobb (*RNA polymerase II largest subunit*, *RPB1*) és második legnagyobb alegységét (*RNA polymerase II second largest subunit*, *RPB2*) kódoló gének szekvenciarezszeleteinek *Maximum Likelihood*, *Maximum parsimonia* és Bayes-féle analízisével készítette el azt az átfogó és jó támogatottsági értékeket mutató törzsfát, amely a *Fusarium*-ok nemzetségen belüli és rokon nemzetségekkel való evolúciós kapcsolatait mutatja be (**1. ábra**). A törzsfán F1 jelzéssel ellátott elágazás az ún. "terminális *Fusarium* klád"-ot (TFK) jelöli, amely 20, magas támogatottságú fajkomplexumból és további 9 monotipikus leszármazási vonalból áll, magába foglalva a leggyakoribb humán kórokozó fajokat, illetve fajkomplexumokat. A TFK jelenti a legtágabb értelemben vett *Fusarium* nemzetséget, ami viszont kizárólag a Bayes-analízis során kapott magas támogatottsági értéket. Ezzel szemben a TFK-n belüli F2 és F3 elágazások (**1. ábra**) mindhárom törzsfán jó támogatottsági értékekkel szerepeltek. Ez felvetette annak a lehetőségét, hogy a továbbiakban a nemzetség határát vagy az F2, vagy az F3 nóduszok jelöljék. Az első lehetőség az FDSC és a *Fusarium ventricosum* fajkomplexum (*F. ventricosum species complex*, FVSC), a második pedig a fentiekén túl az egyik leggyakoribb és legismertebb fajkomplexum, az FSSC új nemzetségekbe történő áthelyezését és ezzel együtt átnevezését jelentené (O'Donnell és mtsai. 2013, van Diepeningen és mtsai. 2014).



1. ábra: A *Fusarium*-okat és rokon nemzetségeiket bemutató kladogram (Geiser és mtsai. 2013, O'Donnell és mtsai. 2013). **F1**: A *Fusarium* nemzetség Geiser és munkatársai (2013) által elfogadott határait meghatározó nódusz; **F2**: a *Gibberella* klád és a *F. solani* fajkomplexum együttesét meghatározó nódusz; **F3**: a *Gibberella* kládot meghatározó nódusz; **A**: legtágabb értelemben vett *Fusarium* nemzetség, amely magába foglalja a *F. solani* és *F. dimerum* fajkomplexumokat is **B**: a *Gibberella* klád; **C**: a *F. solani* fajkomplexum; **D**: az ideiglenes státuszban lévő *F. dimerum* fajkomplexum.

Mindezek ismeretében Geiser és munkatársai (2013) a *Fusarium* nemzetség lehető legrészleesebb értelemben vett megtartása mellett érvelnek. A *Fusarium* elnevezést valamennyi növénypatológiai, mikotoxikológiai, egészségügyi, és így az alkalmazott biológiai kutatások szempontjából jelentős faj esetében megtartanák. Emellett újabb vizsgálatok elvégzésének szükségességét hangsúlyozzák az FDSC és FVSC hovatartozásának tisztázása érdekében, így ideiglenesen mindkét fajkomplexum továbbra is a *Fusarium* nemzetség részét képezi.

Ezzel szemben Lombard és munkatársai (2015) a *Fusarium* nemzetséget a lehető legrészleesebben értelmezi, és az F3 nódusz által meghatározott ún. *Gibberella* kládra korlátozza. Az FDSC-t a *Bisfusarium* nemzetségbe sorolja át, és felveti a *Gibberella* klád további, kisebb nemzetségekre bontásának lehetőségét is a jelenlegi fajkomplexumok nemzetség szintre emelésével.

A dolgozat elkészítése során a Geiser és munkatársai (2013) által megfogalmazott taxonómiai koncepciót követtük.

### **3.2. A *Fusarium* nemzetség klinikai jelentősége**

Jelentős mezőgazdasági kártételük mellett a *Fusarium* fajok a humán megbetegedések széles spektrumával hozhatók összefüggésbe: felületi fertőzéseket (szaruhártya-gyulladás, köröm- és bőrgombásodás), invazív helyi vagy disszeminált fertőzéseket, allergiás megbetegedéseket (ormelléküreg-gyulladás), valamint mikotoxikózisokat okozhatnak (Garnica és Nucci 2013). A jelenleg ismert fajkomplexumok közül összesen 10 rendelkezik humánpatogén képviselővel (**1. táblázat**, Al-Hatmi és mtsai. 2016a). Ezek között az FSSC a leggyakoribb: a világszerte regisztrált fuzáriózisok 50-60%-ért felelős (O'Donnell és mtsai. 2010, van Diepeningen és mtsai. 2014).

Az első humán *Fusarium* keratitiszt alig több mint 50 éve, 1958-ban regisztrálták (Mikami és Stemmermann 1958). Azóta a nemzetség képviselőit a fejlődő országok trópusi és szubtrópusi vidékein - így Indiában is - gyakran izolálják humán szaruhártya fertőzésekből. Gyakoriság szempontjából az ország északi és keleti területein egyedül az *Aspergillus* nemzetség előzi meg őket (Chander és mtsai. 2008, Rautaraya és mtsai. 2011), viszont Dél-Indiában a legfrissebb felmérések szerint a *Fusarium* fajok, ezen belül pedig az FSSC képviselői felelősek a regisztrált keratomikózisos esetek túlnyomó többségéért a felnőttek és a gyermekek körében egyaránt (Bharathi és mtsai. 2003, Srinivasan 2004, Bharathi és mtsai. 2007, Lalitha és mtsai. 2008b, Chakrabarti és Singh 2011, Aruljyothi és mtsai. 2016).

**1. táblázat: Klinikai jelentőséggel rendelkező *Fusarium* fajkomplexumok és fajok (van Diepeningen és mtsai. 2014, Al-Hatmi és mtsai. 2016a alapján).**

<b>Fajkomplexum</b>	<b>Faj</b>	<b>Okozott megbetegedés</b>
FDSC	<i>Fusarium dimerum</i>	Szaruhártya-, köröm-, bőr-, disszeminált fertőzés
	<i>Fusarium delphinoides</i> <i>Fusarium penzigii</i> 2 név nélküli haplotípus	Keratitisz, disszeminált fertőzés Szaruhártya-gyulladás -
FCSC	3 név nélküli haplotípus	Szaruhártya-, köröm-, bőr-, disszeminált fertőzés
FCOSC	<i>Fusarium concolor</i>	Szaruhártya-gyulladás
	<i>Fusarium polyphialidicum</i>	Szaruhártya-gyulladás
FFSC	<i>Fusarium acutatum</i>	Köröm-, lokális invazív fertőzés
	<i>Fusarium ananatum</i>	Felületi fertőzés
	<i>Fusarium andiyazi</i>	Disszeminált fertőzés
	<i>Fusarium fujikuroi</i>	Bőrfertőzés
	<i>Fusarium globosum</i>	Disszeminált fertőzés
	<i>Fusarium guttiforme</i>	Körömfertőzés
	<i>Fusarium musae</i>	Felületi és disszeminált fertőzés
	<i>Fusarium napiforme</i>	Lokális invazív, disszeminált fertőzés
	<i>Fusarium nygamai</i>	Bőr-, lokális invazív fertőzés
	<i>Fusarium proliferatum</i>	Szaruhártya-, köröm-, lokális invazív, disszeminált fertőzés
	<i>Fusarium ramigenum</i>	Lokális invazív (tüdő-) fertőzés
	<i>Fusarium sacchari</i>	Keratitisz, köröm-, bőr-, lokális invazív, disszeminált fertőzés
	<i>Fusarium subglutinans</i>	Szaruhártya-, lokális invazív fertőzés
	<i>Fusarium temperatum</i>	Szaruhártya-gyulladás
<i>Fusarium thapsinum</i>	Szaruhártya-, lokális invazív, disszeminált fertőzés	
FIESC	<i>Fusarium verticillioides</i>	Szaruhártya-, köröm-, bőr-, lokális invazív, disszeminált fertőzés
	<i>Fusarium equiseti</i> <i>Fusarium lacertarum</i> 18 név nélküli haplotípus	Szaruhártya-, köröm-, bőr-, lokális invazív, disszeminált fertőzés
FLSC	<i>Fusarium lateritium</i>	Szaruhártya-, disszeminált fertőzés
FOSC	3 név nélküli haplotípus ( <i>F. oxysporum sensu lato</i> )	Szaruhártya-, köröm-, bőr-, disszeminált fertőzés
FSAMSC	<i>Fusarium armeniacum</i>	Tüdőfertőzés
	<i>Fusarium brachygibbosum</i>	Bőrfertőzés
	<i>Fusarium langsethiae</i>	Szaruhártya-gyulladás
	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Bőr-, lokális invazív fertőzés
FSSC	<i>Fusarium falciforme</i>	Szaruhártya-, köröm-, bőr-, lokális invazív, disszeminált fertőzés
	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	Szaruhártya-, köröm-, bőr-, lokális invazív, disszeminált fertőzés
	<i>Fusarium lichenicola</i>	Szaruhártya-, bőr-, lokális invazív, disszeminált fertőzés
	<i>Fusarium petroliphilum</i>	Szaruhártya-, lokális invazív, disszeminált fertőzés
	<i>Fusarium pseudensiforme</i> 17 név nélküli haplotípus ( <i>F. solani sensu lato</i> )	Szaruhártya-gyulladás Szaruhártya-, köröm-, bőr-, lokális invazív, disszeminált fertőzés
FTSC	<i>Fusarium acuminatum</i>	-
	<i>Fusarium flocciferum</i> 2 név nélküli haplotípus	Bőrfertőzés -

**FDSC:** *Fusarium dimerum* fajkomplexum, **FCSC:** *Fusarium chlamydosporum* fajkomplexum, **FCOSC:** *Fusarium concolor* fajkomplexum, **FFSC:** *Fusarium fujikuroi* fajkomplexum, **FIESC:** *Fusarium incarnatum-equiseti* fajkomplexum, **FLSC:** *Fusarium lateritium* fajkomplexum, **FOSC:** *Fusarium oxysporum* fajkomplexum, **FSAMSC:** *Fusarium sambucinum* fajkomplexum, **FSSC:** *Fusarium solani* fajkomplexum, **FTSC:** *Fusarium tricinctum* fajkomplexum.

Ritkán az FDSC, FOOSC, FFSC, FIESC, *Fusarium sambucinum* (*F. sambucinum* species complex, FSAMSC), *Fusarium concolor* (*F. concolor* species complex, FCOSC) és *Fusarium lateritium* (*F. lateritium* species complex, FLSC) fajkomplexumok képviselői hozhatók összefüggésbe a fertőzéssel (Guarro és mtsai. 2003, Naiker és Odhav 2004, Vasantha Ruban és mtsai. 2015, Hassan és mtsai. 2016).

Az FSSC tagjai a talajból leggyakrabban izolált gombák közé tartoznak (Zhang és mtsai. 2006). Amellett, hogy jelentős növénypatogének, a humán fuzáriózisok mintegy kétharmadáért tehető felelőssé (O'Donnell és mtsai. 2008). Az általuk okozott fertőzések gyakoriságára talán magyarázattal szolgálhat egy korábbi állatkísérlet, amelyben az FSSC tagjai a nemzetség más képviselőihez (*F. oxysporum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum*) képest virulensebbnek bizonyultak (Mayayo és mtsai. 1999). Az FSSC képviselői a többi *Fusarium* fajkomplexumhoz viszonyítva *in vitro* és *in vivo* körülmények között is kevésbé reagálnak a különböző antifungális szerekkel történő kezelésekre (Azor és mtsai. 2007). Napjainkban az FSSC-n belül legalább 60 haplotípus ismert, melyek közül 22 klinikai jelentőséggel is rendelkezik (van Diepeningen és mtsai. 2014, Al-Hatmi és mtsai. 2016a, **1. táblázat**). Ezek többsége továbbra sem rendelkezik latin elnevezéssel, kivételt képez ez alól az FSSC 3+4, vagyis a *Fusarium falciforme*, az FSSC 16, vagyis a *Fusarium lichenicola*, továbbá az FSSC 1 és FSSC 2 haplotípusok, amelyeket Short és munkatársai (2013) *Fusarium petroliphilum*-ként és *Fusarium keratoplasticum*-ként írtak le.

Az FOOSC a nemzetség legtöbb növénypatogén képviselőt magába foglaló, és így gazdasági szempontból az egyik legfontosabb csoportja. O'Donnell és munkatársai (2009a) a translációs elongációs faktor  $1\alpha$ -t (*translation elongation factor 1\alpha*, *TEF1*) kódoló gén és az IGS (*intergenic spacer*, gének közötti elválasztó) régió szekvenciái alapján 256 szekvenciatípust különítettek el a komplexumon belül, melyek közül 26-ot írtak le humán fertőzésekből is. Helyi (dermatitisz, keratitisz, orrmelléküreg-gyulladás) és szisztémás humán mikózisokat egyaránt okozhatnak (van Diepeningen és mtsai. 2014, **1. táblázat**).

Az FFSC a legfrissebb irodalmi adatok alapján 45 filogenetikai fajt foglal magába (Al-Hatmi és mtsai. 2015a), melyek közül hivatalosan, morfológiai jellemzőikkel együtt 34-et írtak le 2015-ig (Al-Hatmi és mtsai. 2015b). Jelentős mezőgazdasági kártevők, emellett különböző toxikus másodlagos metabolitokat, így például fumonizineket, moniliformint és beauvericint termelnek (Nirenberg és O'Donnell 1998). A fajkomplexum képviselői kozmopoliták, világszerte okoznak humán megbetegedéseket. Ez alól néhány faj képez kivételt, a *Fusarium acutatum*, *Fusarium antophilum*, *Fusarium andiyazi*, *Fusarium nygami* és *Fusarium sacchari* elterjedése csak bizonyos földrajzi/éghajlati körülmények között

jellemző (van Diepeningen és mtsai. 2014). Napjainkig az FFSC 16 fajt azonosították különböző humán megbetegedésekből, főként mély invazív fertőzésekből (**1. táblázat**, Al-Hatmi és mtsai. 2016a). Ezek közül a *F. proliferatum* és *F. verticillioides* a leggyakoribbak (van Diepeningen és mtsai. 2014). Keratitiszből ez idáig a fajkomplexum 5 fajt (*F. proliferatum*, *F. sacchari*, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium thapsinum*, *F. verticillioides*) írták le (van Diepeningen és mtsai. 2014). A Magyarországon ismert egyetlen *Fusarium* keratitiszes esetből izolált kórokozó szintén *F. verticillioides*-nek bizonyult (Dóczy és mtsai. 2004).

Az FDSC legalább 12, filogenetikailag elkülöníthető fajt foglal magába, amelyek elsősorban talajból, elpusztult növényi részekről izolálhatók. Ritkábban humán megbetegedésekből (köröm- és bőrgombásodás, keratitisz, lokális invazív vagy disszeminált fertőzések) is azonosítják őket. Napjainkig a fajkomplexum tagjai közül a *F. dimerum*-ot, *Fusarium delphinooides*-t és *Fusarium penzigii*-t írták le humán keratitiszből, illetve emellett további két, jelenleg még név nélküli fajt egyéb fertőzésekből (Schroers és mtsai. 2009, **1. táblázat**).

Az FIESC legalább 28 filogenetikailag elkülöníthető fajt foglal magába, amelyek egyenlő arányban oszlanak meg az Incarnatum és Equiseti kládok között. Az Incarnatum kládhoz tartozó fajok egyike sem, míg az Equiseti kládból napjainkig összesen 3, a *Fusarium lacertarum* (FIESC 4), a *Fusarium scripi* (FIESC 9) és a *Fusarium equiseti* (FIESC 14) rendelkezik latin elnevezéssel. Elsősorban talajban, növényi részeken fordulnak elő, a banán raktári kártevőiként is ismertek (Leslie és Summerell 2006). Különböző másodlagos metabolitokat, így például a fitotoxikus és enyhe antibiotikus hatású equisetint, valamint mikotoxinokat, ezen belül A és B típusú trichotecéneket és zearalenont termelnek. A zearalenon komoly állategészségügyi problémákért, például az ösztrogén szindróma nevű kórképert tehető felelőssé; a trichotecének pedig állatokra és emberekre egyaránt veszélyt jelentenek, dermatotoxikus, citotoxikus és fitotoxikus hatásúak (Varga 2003, Minervini és Dell'Aquila 2008). A 28 fajból legalább 20 hozható összefüggésbe humán vagy állati mikózisokkal (O'Donnell és mtsai. 2009b, **1. táblázat**). Mind az Equiseti, mind az Incarnatum klád képviselőit izolálták már több alkalommal köröm-, bőr-, szem-, mély lokális és disszeminált fertőzésekből, főleg leukémiás betegek esetében (van Diepeningen és mtsai. 2014).

### 3.2.1. *Fusarium keratitis*

Az Egészségügyi Világszervezet felmérése szerint a szaruhártyát érintő megbetegedések továbbra is a vakság vezető okai között szerepelnek a világon. Különösen igaz ez a fejlődő országokra, így például Indiára is, ahol évente 25-30 ezer ember veszíti el látását. Ez alapján, előzetes becslések szerint az országban 2020-ra megközelítőleg 10,6 millióan szenvednek majd valamilyen szaruhártyát érintő megbetegedés következtében kialakult látáskárosodásban vagy látásvesztésben (Srinivasan 2007, Gupta és mtsai. 2013).

A szaruhártyát érintő megbetegedések között kiemelkedő jelentőséggel rendelkezik a mikrobiális keratitisz (szaruhártya-gyulladás). Indiában a keratitiszes esetek legnagyobb hányadát baktériumok vagy gombák okozzák, ritkábban protozoák. A leírt kórokozók gyakorisága földrajzi régióként, illetve az azokra jellemző klimatikus viszonyok függvényében változik (Bharathi és mtsai. 2007).

A keratomikózis, vagyis a szaruhártya élesztő- vagy fonalagombák által okozott gyulladása elsősorban a fejlődő országok trópusi és szubtrópusi területein gyakori. Főként a középkorú férfi lakosságot érinti, ezen belül is különösen a mezőgazdaságban dolgozók körében jellemző (Bharathi és mtsai. 2003). Dél-Indiában a keratomikózist a szaruhártya-eredetű vakság vezető okai között tartják számon (Srinivasan 2004).

Egy több mint 3000 beteget érintő felmérés szerint Dél-Indiában a keratomikózis leggyakoribb kiváltó oka a szemet/szaruhártyát érintő trauma (Bharathi és mtsai. 2007). Ilyenkor a sérülést okozó, általában növényi vagy állati eredetű ágensek vagy közvetlenül juttatják a gomba konídiumait a szaruhártya sztrómájába, vagy az epitélium megsértésével nyitnak utat a fertőzés előtt a szaruhártya mélyebb rétegei felé (Thomas 2003). Bharathi és munkatársai (2007) megfigyelései szerint a szisztémás betegségekben, cukorbetegségben vagy valamilyen szembetegségben szenvedők körében szintén gyakoribb a keratomikózis előfordulása. Emellett egy korábbi tanulmány alapján a szteroidok helyi használata, valamint a kontaktlencse viselése is növeli a gombás szemfertőzések kialakulásának esélyét (Srinivasan 2004). A 2005-2006-os, ún. *Fusarium keratitis* járvány hátterében szintén a kontaktlencse-használat, pontosabban a Bausch and Lomb cég által gyártott *ReNu MoistureLoc* kontaktlencse tárolófolyadék használata állt. Az USA-ban közel 200, Szingapúrban 66, Malajziában, Kínában, Indiában és Európában pedig további néhány esetet regisztráltak (Epstein 2007). Több más tényező mellett a járvány egyik lehetséges oka a készítmény nem kontrollált tárolási és szállítási hőmérséklete lehetett, amely során a kontaktlencse tárolófolyadék elveszthette antifungális hatását (Bullock és mtsai. 2008). Mukherjee és

munkatársai (2012) pedig a *Fusarium*-ok nagyfokú biofilmképző sajátságát emelték ki, ami szintén hozzájárulhatott a járvány terjedéséhez.

### **3.2.1.1. A *Fusarium* keratitisz diagnosztizálása és a kórokozó azonosítása**

A keratomikózis során kialakult szaruhártyafekély felülete jellemzően száraz és domború, határai nem élesek, inkább pehelyszerűek. Emellett gyakran figyelhetőek meg ún. szatellita infiltrátumok (a központi infiltrátumtól távolabb megjelenő, kisebb beszűrődések) és hypopyon (az elülső csarnokban összegyűlt gennyes váladék) is a gyulladt szemben. Keratomikózis esetében - szemben például a bakteriális eredetű fertőzéssel - a betegség jelei, mint például a fekély mérete, sokkal kifejezettebbek, mint a beteg által tapasztalt tünetek (Lalitha és mtsai. 2008b). A tünetek általában nem specifikusak és a bakteriális keratitiszhez képest hosszabb ideig jelentkeznek (Thomas 2003). A betegek gyakran számolnak be idegentest-érzésről a szemben, fényérzékenységről, könnyezésről, fokozódó fájdalomról (Graff és mtsai. 2006).

A pontos diagnózis, valamint a megfelelő kezelés érdekében elengedhetetlen a kórokozó minél pontosabb, lehetőség szerint fajszintű azonosítása. Különösen igaz ez a *Fusarium*-ok esetében, ahol a fajkomplexumok, és azokon belül az egyes fajok is eltérő antifungális érzékenységet mutathatnak (Tortorano és mtsai. 2008, van Diepeningen és de Hoog 2016).

A klinikai gyakorlatban a kórokozó azonosítása általában egy többlépcsős folyamat, amely az érintett szem réslámpa/szemészeti/konfokális mikroszkóp segítségével történő közvetlen vizsgálatával, majd a szaruhártya, illetve a fekély felszínéről vett kenet mikroszkópos vizsgálatával történik. A kenetben található kórokozókat különböző tápközegeken is kitenyésztik, majd makro- és mikroszkópos bélyegek alapján azonosítják. A *Fusarium*-ok esetében ilyen makromorfológiai bélyeg a telep növekedési rátája, pigmentáltsága és a táptalajba kiválasztott színanyagok milyensége is. A legfontosabb mikromorfológiai jellegzetességeket a makrokonídiumok viselik magukon, ilyenek a méret, alak, a szeptumok száma, az apikális és bazális sejtek alakja. Emellett az azonosítás során figyelembe veszik a mikrokonídiumok jelenlétét/hiányát, méretét, alakját és a fialid morfológiáját. Továbbá a csak az idősebb telepekre jellemző, hosszú idő eltelte után egyedülállóan, párban vagy láncban képződő klamidospórák megléte is fontos határozó bélyeg (Leslie és Summerell 2006).

A pontos morfológiai azonosításhoz az izolátumokat speciális, sztenderdizált körülmények között, adott táptalajon és hőmérsékleten kell tenyészteni. Az elkülönítésre szolgáló karakterek, így például a klamidospórák megjelenéséhez akár több hetes inkubációs



időre is szükség lehet. Az egyes fajkomplexumokhoz tartozó fajok általában hasonló morfológiai bélyegekkel rendelkeznek, elkülönítésük így igen nehézkes. Ráadásul a klinikai *Fusarium* izolátumok gyakran képeznek degenerált telepeket, amelyek vagy nem képeznek légmicéliumokat és így mikrokonídiumokat sem, vagy steril, többnyire fehér micéliumokkal rendelkeznek. Határozóbélyegek hiányában ezek az izolátumok csakis molekuláris biológiai módszerekkel azonosíthatók (Leslie és Summerell 2006, van Diepeningen és mtsai. 2014).

A molekuláris biológiai módszerek közül a legmegbízhatóbb eredményeket a szekvenciaalapú azonosítás szolgáltatja. A gombák azonosítására az ITS (*internal transcribed spacer*), vagyis a sejtmagi riboszómális RNS-t kódoló génklaszter köztes átírózó elválasztó régiója az általánosan elfogadott és alkalmazott DNS-szakasz (Schoch és mtsai. 2012). Mivel a *Fusarium*-ok esetében az ITS-régió rendkívül konzervált, ezért az újabban divergálódott kládok elkülönítésére, faj-, illetve sok esetben fajkomplexum-szintű azonosításra sem alkalmas (O'Donnell és mtsai. 2013, van Diepeningen és mtsai. 2014). A korábbi években többek között a  $\beta$ -tubulin gén *TUB* régióját, a mitokondriális rDNS kis alegységét (*mitochondrial small subunit, mtSSU*), valamint a kalmodulin gén egy szakaszát is használták a *Fusarium*-ok azonosítása során (Leslie és Summerell 2006, Azor és mtsai. 2009). Napjainkban viszont a *TEF1*, *RPB1*-t és az *RPB2*-t kódoló gének szekvenciárészleteit tekintik a *Fusarium*-ok fajsztintű azonosítására legalkalmasabb, filogenetikai szempontból leginkább informatív markereknek (O'Donnell és mtsai. 2015).

A mezőgazdasági és egészségügyi szempontból jelentős *Fusarium*-ok egyre intenzívebb kutatásával szükségessé vált egy olyan folyamatosan bővülő, a világ bármely pontján elérhető online adatbázis létrehozása, amely kizárólag megbízható forrásból származó, validált szekvenciákat tartalmaz, ezzel biztosítva a további vizsgálatok alapját képező, minél pontosabb fajmeghatározást. Így indult el 2004-ben a FUSARIUM-ID (<http://isolate.fusariumdb.org>), ami az aktuálisan ismert *Fusarium* fajok *TEF1* szekvenciáit tartalmazta (Geiser és mtsai. 2004). Majd a kezdeményezéshez a holland *Centraalbureau voor Schimmelcultures Fungal Biodiversity Centre - Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences* (CBS-KNAW) kutatóintézet is csatlakozott, az adatbázist saját honlapján is elérhetővé tette (<http://www.cbs.knaw.nl/Fusarium>) és *Fusarium MLST* néven működteti. 2004 óta az adatbázis tovább bővült, így jelenleg a *TEF1* mellett az *RPB1* és az *RPB2* alapján is azonosítható a keresett, ismeretlen fajhoz tartozó *Fusarium* izolátum (O'Donnell és mtsai. 2010).

Jelenleg az MLST technika a *Fusarium*-ok fajsztintű azonosítására legalkalmasabb molekuláris módszer. Lényege, hogy egyszerre több (általában háztartási) gén

szekvenciareészlete alapján végzik el az azonosítást, majd minden észlelt szekvenciabeli különbséghez egy-egy allélszámot rendelnek, ami alapján szekvenciatípusokat határoznak meg. A nemzetség, illetve a különböző fajkomplexumok azonosítására számos MLST séma került kidolgozásra az elmúlt évek során. Legtöbbjük más szekvenciák mellett a *TEFI*-et és/vagy az *RPB2*-t használja, ugyanis ezt a két szekvenciareészletet tartják az MLST szempontjából leginkább informatív, a legtöbb, *Fusarium*-azonosítás szempontjából releváns megkülönböztető jegyet hordozó régiónak (van Diepeningen és mtsai. 2015).

A *Fusarium*-ok azonosítása emellett számos más, DNS-alapú módszerrel lehetséges, ezen belül is főként polimeráz láncreakció (PCR) alapú technikákat találunk a szakirodalomban. Ezek legfőbb előnye, hogy viszonylag kis mennyiségű minta is elegendő az azonosítás elvégzéséhez. Fajszintű meghatározásra azonban általában nem alkalmasak és kereskedelmi forgalomban is ritkán érhetőek el (van Diepeningen és mtsai. 2014). Az első ilyen, a *Fusarium* keratitisz diagnosztizálására is alkalmas módszert Alexandrakis és munkatársai (1998) dolgozták ki, amely a kutináz gén egy részletének amplifikálásán alapult. Jelenleg már számos hasonló eljárás áll a rendelkezésünkre, ami lehetővé teszi a *Fusarium*-ok viszonylag egyszerű és gyors detektálását. A Faria és munkatársai (2012) által leírt multiplex PCR például az FFSC tagjainak fajszintű meghatározását teszi lehetővé. Muraosa és munkatársai (2014) egy új, specifikus, rendkívül érzékeny *real-time* PCR rendszert dolgoztak ki, amely hatékonyan mutatta ki a *Fusarium* nemzetség, illetve az FSSC tagjainak jelenlétét a tesztelt mintákban. O'Donnell és munkatársai (2007) a 2005-2006-os *Fusarium* keratitisz járványt követően 72 keratitisz-izolátum *RPB2* génszekvenciája alapján 32 allélspecifikus próbát terveztek és kidolgoztak egy új, áramlási citometrián és fluoreszcens mikroszféra-technológián alapuló azonosítási módszert a klinikai szempontból jelentős *Fusarium* fajkomplexumok azonosítására. Wang és munkatársai (2011) egy PCR-alapú hibridizációs technikát dolgoztak ki. Az általuk publikált, ún. *reverse line blot* (RLB) eljárás során az azonosítani kívánt mintából származó DNS-ből biotinnal jelölt, *Fusarium* specifikus primerek alkalmazásával felszaporították az IGS régió egy szakaszát, majd ezt követően egy membránhoz specifikus (1 nemzetség-, 13 fajkomplexum- és 52 fajspecifikus) próbákat kötöttek, majd erre vitték fel a jelölt PCR-termékeket, a kapott jeleket pedig kemilumineszcens kit segítségével detektálták. A módszer rendkívül megbízhatónak bizonyult, ugyanis az RLB-vel kapott eredmények minden esetben megegyeztek az MLST-analízis eredményével (Wang és mtsai. 2011).

A *Fusarium*-ok azonosítása különböző fehérjealapú módszerekkel is lehetséges. Így például számos *Fusarium*-specifikus ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*, enzimhez

kötött immunszorbens módszer) teszt érhető el kereskedelmi forgalomban, azonban ezeket a klinikai gyakorlatban nem alkalmazzák. Az egyes antitestek általában csak nemzetség- és nem fajspecifikusak, így fajmeghatározásra nem alkalmazhatók (van Diepeningen és mtsai. 2015). A MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionization - time-of-flight*, mátrix által segített lézer deszorpció ionizáció - repülési idő) tömegspektrometriai analízis egy igen érzékeny és gyors technika, ami az egyes mikroorganizmusokra jellemző fehérjespektrumok azonosításán alapul. Egy futás során egymással párhuzamosan több minta azonosítása is megtörténhet, akár egy órán belül (Marinach-Patrice és mtsai. 2009). A módszer a *Fusarium* fajkomplexumokon belül az egyes fajok elkülönítésére is alkalmas (De Carolis és mtsai. 2012). Hátránya viszont, hogy az analízishez tiszta tenyészetekre van szükség, közvetlenül a páciensből származó mintából egyelőre nem lehetséges (van Diepeningen és mtsai. 2014). A módszer legfőbb limitáló tényezője az azonosításhoz felhasznált adatbázis alapját képező törzsek forrásának megbízhatósága, meghatározásuk pontossága (van Diepeningen és mtsai. 2015). Ananthi és munkatársai (2013) a *Fusarium* keratitisz különböző szakaszaiban vizsgálták a könny fehérje-összetételét. Az általuk azonosított specifikus fehérjék a jövőben biomarkerként segíthetik a betegség diagnosztizálását és kezelését.

Habár a klinikai gyakorlatban alkalmazott morfológiai módszerekhez viszonyítva a PCR- és fehérjealapú módszerek megbízhatóbbak és sok esetben meggyorsítják az azonosítás folyamatát, eszköz- és költségigényük magasabb. Emiatt a fejlődő országokban - vagyis a *Fusarium* keratitisz által leginkább érintett területeken - nem érhetőek el.

### **3.2.1.2. A *Fusarium* keratitisz kezelésének lehetőségei napjainkban**

A gombás szemfertőzések általában nehezen gyógyíthatók. Lalitha és munkatársai (2006) tanulmányukban arról számoltak be, hogy a regisztrált esetek 31%-ában sikertelennek bizonyult a megkezdett terápia. Ez több okra vezethető vissza. Klinikai kísérletek hiányában továbbra sem ismert a kapcsolat a humánpatogén *Fusarium*-ok molekuláris rezisztencia mechanizmusai, az alacsonyabb és magasabb MIC-értékek, valamint a terápiára adott válasz között (Espinel-Ingroff és mtsai. 2015). A kórokozó antifungális szerek iránti *in vitro* érzékenysége sok esetben nem jelzi előre a kezelés hatékonyságát, ugyanis a gazdaszervezet egyéni jellemzői, az alkalmazott szer sajátosságai, felszívódási sebessége, a szem szöveteiben elérhető maximális koncentrációja szintén befolyásolják a terápia végkimenetelét (Lalitha és mtsai. 2008b). Emellett a megfelelő antifungális szer kiválasztását - és így a hatékony betegellátást - tovább nehezíti a humán megbetegedést okozó *Fusarium*-okkal kapcsolatban gyakran tapasztalt, a klinikai gyakorlatban alkalmazott antimikotikumokkal szembeni

rezisztencia (Tortorano és mtsai. 2014, Al-Hatmi és mtsai. 2015a, Al-Hatmi és mtsai. 2016a). *In vitro* az echinokandinok (pl. kaszpopungin, mikafungin), az azolok (pl. flukonazol, itrakonazol, ketokonazol, ravukonazol, pozakonazol) és a TRB is több esetben hatástalannak bizonyultak *Fusarium*-okkal szemben (Thomas 2003, Lalitha és mtsai. 2007, Alastruey-Izquierdo és mtsai. 2008, Guarro 2013, Al-Hatmi és mtsai. 2015a). A Prajna és munkatársai (2012) által elvégzett kutatások alapján a már kialakult szaruhártyafekély a megfelelő kezelés mellett is nehezen gyógyítható. Minél előrehaladottabb a fertőzés és ezzel együtt minél nagyobb a fekély kiterjedése, annál kisebb az esély a teljes körű gyógyulásra és a látás megőrzésére. A fertőzés kezdeti stádiumban történő felismerése és a fekély kialakulásának megakadályozása ezért kiemelt fontosságú a keratomikózis hatékony gyógyításában (Prajna és mtsai. 2012).

A *Fusarium* keratitisz kezelése a fertőzés súlyosságától függően változhat. Kezdeti stádiumban általában lokálisan történik, antifungális hatású szemcseppek napi többszöri alkalmazásával. A klinikumban napjainkban lokálisan alkalmazott antifungális szerek a következők:

- Amfotericin B (0,15% w/v, AMB) - gyengén szívódik fel a szaruhártya intakt epitéliumán keresztül (Lalitha és mtsai. 2008b). A jelenleg forgalomban lévő szemcseppek deoxikolátot tartalmaznak, ami az erősen hidrofób tulajdonságú AMB oldatban tartásához szükséges, viszont toxikus hatású, a szaruhártya irritációját okozza. A liposzomális AMB-t tartalmazó készítmények új, alternatív megoldást jelentenek erre a problémára (Morand és mtsai. 2007).

- Ekonazol (1% w/v, ECN) - fonalagombákkal szembeni hatékonysága egy klinikai kísérlet során megegyezett a NTM hatékonyságával (Prajna és mtsai. 2003). Alkalmazása kellemetlen helyi tüneteket, irritációt okozhat (Thomas 2003).

- Itrakonazol (1% w/v, ITC) - habár *in vitro* tesztek alapján a *Fusarium*-ok növekedését nem gátolja (Thomas 2003, Lalitha és mtsai. 2007), Indiában a klinikai gyakorlatban továbbra is alkalmazzák a *Fusarium* keratitisz kezelésére, elsősorban más antifungális szerekkel (pl. ECN, NTM, vorikonazol) kombinációban.

- Klotrimazol (1% w/v, CLT) - tartós használata toxikus lehet a szaruhártyára (Thomas 2003), monoterápiás alkalmazása nem ajánlott a *Fusarium* keratitisz kezelésére (Mselle 2001). A keratitiszből származó *Fusarium*-ok *in vitro* érzékenysége változó: a Sun és munkatársai (2015) által vizsgált izolátumok rezisztensnek bizonyultak a CLT-vel szemben,

míg Hassan és munkatársai (2016) eredményeik alapján a leghatékonyabb *Fusarium*-ellenes szerek között említik a CLT-t.

- Natamicin (5% w/v, NTM) - jelenleg ez az egyik leggyakrabban alkalmazott és egyben az egyetlen Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerbiztonsági Felügyelet (FDA) által elfogadott antifungális hatású szemcsepp. A szem mélyebb szöveteibe viszonylag gyengén szívódik fel, ezért elsősorban a kezdeti stádiumú, kevésbé súlyos fertőzések esetén hatékony (Prajna és mtsai. 2010). Hátránya, hogy drága és biohasznosulása a teljes bevitt hatóanyag kb. 2%-a (Thomas 2003, Lalitha és mtsai. 2008b). Ez utóbbira megoldást jelenthet a Jain és munkatársai (2015) által kidolgozott módszer: a NTM-t egy sejtpenetráló peptidhez konjugáltatták, ami nemcsak a hatóanyag humán szaruhártya epitélisejtjeibe való felvételének mértékét növelte meg, hanem vízdékonyságát és antifungális hatását is fokozta *F. solani*-val szemben.

- Vorikonazol (1% w/v, VRC) - felszívódása az NTM-hez viszonyítva sokkal jobb, ami alkalmasabbá teszi az előrehaladottabb stádiumban lévő, mélyebb fekélyek kezelésére. Loh és munkatársai (2009) felmérése szerint a VRC-vel történő kezelések során ritkábban látták szükségesnek a szaruhártya epitéliumának kaparással történő eltávolítását a hatóanyag felszívódásának elősegítése érdekében. A csarnokvízben elérhető VRC-koncentrációt több tanulmány is vizsgálta: a párhuzamosan történő orális és lokális adagolás mellett a legtöbb gomba esetében korábban leírt MIC-érték feletti koncentrációt (2,93-3,40 µg/ml) mértek, az 1%-os szemcsepp egyedüli alkalmazásával ez 0,61 és 3,30 µg/ml között változott (Thiel és mtsai. 2007, Lau és mtsai. 2008). A NTM helyett alternatív megoldást jelenthet a VRC, de a *Fusarium* keratitisz kezelésében kevésbé bizonyult hatékonynak, ezért monoterápiás alkalmazása nem ajánlott (Prajna és mtsai. 2013).

Mindemellett Liang és munkatársai (2009) eredményei alapján a TRB (0,25% w/v) szemcseppek szintén alkalmasak a fonalasgombák által okozott szemfertőzések kezelésére, különösen a kisebb, felszínesebb fekélyek esetében, habár a kezelés átlagos időtartama az NTM-hez képest hosszabbnak bizonyult. A pozakonazol lokális és szisztémás együttes alkalmazásával is értek el sikereket a más antifungális szerekre nem reagáló *Fusarium* keratitisz gyógyítása során (Altun és mtsai. 2014).

A szaruhártya-gyulladás lokálisan történő kezelésének hátránya, hogy a reflexes könnyezés és pislogás kihígítja és elmossa a kezelendő felületről a hatóanyagot, így az egy cseppben lévő anyag mindössze 1-7%-a szívódik csak fel a szembe, és ennek a dózisonak is csak a töredéke jut a szaruhártyába. Az elérhető terápiás koncentráció még alacsonyabb a rosszabb felszívódási tulajdonsággal rendelkező szerekénél, mint a NTM vagy az AMB. Ez a

probléma a nagyobb gyógyszerhatóanyag-bevitellel kompenzálható. A kezelés kezdeti szakaszában így az előírt szemcseppet óránként (éjjel/nappal) kell alkalmazni (Ciolino és mtsai. 2011). Ez nagy felelősséget ró a páciensre is, ezért Ciolino és munkatársai (2011) kidolgozták egy olyan, a közeljövőben akár terápiásan is alkalmazható kontaktlencse prototípusát, amely fokozatosan bocsátja ki ECN-tartalmát a szaruhártya felületére, és heteken át megőrzi antifungális hatását.

Súlyosabb esetekben a lokális kezelés mellett vagy ahelyett más terápiás megoldásokhoz kell folyamodni:

- antimikotikumok, mint például a VRC (2 x 200-400 mg/nap), flukonazol (50-200 mg/nap), ITC (200 mg/nap) vagy ketokonazol (200-600 mg/nap) orális alkalmazása (Graff és mtsai. 2006).

- Siatiri és munkatársai (2011) tanulmánya szerint a lokális VRC-terápia kiegészítéseként az intrasztrómális VRC-injekciók is sikeresen meggátolták a fertőzés terjedését és csökkentették az infiltráció méretét.

- Abban az esetben, ha a beteg a fentebb felsorolt kezelési módok egyikére sem reagál, műtéti beavatkozásra van szükség: ez jelentheti a szaruhártya epitélium rétegének kaparással történő eltávolítását, ami a lokális kezelés során alkalmazott hatóanyagok jobb felszívódását segítheti elő, vagy súlyosabb esetben az ennél sokkal drasztikusabb szaruhártya-átültetést (Graff és mtsai. 2006).

### **3.3. A kísérletek során alkalmazott illóolajok antifungális hatása**

Az illóolajok növényi részekből nyert illékony, általában sokkomponensű elegyek. Összetevőik másodlagos metabolitok, melyek a növények védekező mechanizmusában játszanak szerepet, így általában antimikrobiális hatással rendelkeznek (Hyltdgaard és mtsai. 2012). Az illóolajok *in vitro* antifungális hatását számos tanulmány alátámasztja. Az eddig elvégzett vizsgálatok középpontjában általában növénypatogén fajok, raktári (posztharveszt) kártevők vagy dermatofita gombák álltak.

Több tanulmányban is a fahéjolaj bizonyult a legerősebb növekedésgátló hatással rendelkező illóolajnak fonalgombákkal szemben (Uniyal és mtsai. 2012, Gömöri és mtsai. 2013). Antifungális hatását, amelyet elsősorban fő komponensének, a fahéjaldehydnek tulajdonítanak, többek között raktári penészekkel (*Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum*, *Rhizopus nigricans*) szemben is igazolták (Xing és mtsai. 2010). Trajano és munkatársai (2012) fahéjolaj-kezelés hatására jelentős változásokat figyeltek meg az *A. flavus* makro- és mikromorfológiájában: a gombafonalak depigmentálódtak, emellett szignifikánsan csökkent a

konidiofórok száma és a konídiumképzés képessége. *Alternaria solani* és *Curvularia lunata* esetében a fahéjolaj gátolta a spórák csírázását (Mishra és mtsai. 2009).

A citromolaj hatástalannak bizonyult a *Fusarium*-okkal szemben *in vitro* (Chuah és mtsai. 2010, Gömöri és mtsai. 2013), viszont a fahéjolajhoz hasonlóan gátolta különböző raktári kártevő fonalgombák (*Botrytis cinerea*, *Penicillium* spp.) micéliális növekedését és konídiumainak csírázását (Vitoratos és mtsai. 2013). A citromos eukaliptuszolaj növénypatogén fonalgombák esetében erőteljes, míg raktári kártevők ellen mérsékelt antifungális hatást mutatott (Ramezani és mtsai. 2002, Javed és mtsai. 2012). Hasonlóan, a kúszó fajdbogyóolaj mérsékelt gátló hatását figyelték meg *Aspergillus* izolátumokkal szemben (Uniyal és mtsai. 2012). A borókaolaj elsősorban dermatofitákkal szemben mutatott erőteljes gátló hatást (Pepeljnjak és mtsai. 2005, Cavaleiro és mtsai. 2006). Hasonlóképpen, a teafa- és kakukkfűolaj is hatékonyan gátolta a dermatofita *Trichophyton* fajok növekedését, nemcsak *in vitro*, hanem *in vivo* körülmények között is (Soković és mtsai. 2008, Pisseri és mtsai. 2009, Flores és mtsai. 2013). Emellett a kakukkfűolaj a *Rhizopus oryzae* és különböző raktári penészfajok micéliális növekedését és spóráinak csírázását is gátolta (de Lira Mota és mtsai. 2012, Vitoratos és mtsai. 2013). A majorannaolaj koncentrációfüggő gátló hatását *Aspergillus* és *Fusarium* fajokkal szemben is megfigyelték (Freire és mtsai. 2011, Gömöri és mtsai. 2013), a muskotályzsályaolaj hatékonyságát pedig *Fusarium*-okkal és más növénypatogén fonalgombákkal szemben bizonyították (Fraternale és mtsai. 2005, Dzamic és mtsai. 2007, Gömöri és mtsai. 2013).

Habár az illóolajok antifungális hatásáról viszonylag sok adat áll rendelkezésünkre, pontos hatásmechanizmusuk kevésbé ismert. Az eddigi kutatások alapján az illóolajok fő célpontjai fonalgombákban a sejtmembrán és a sejtfal. Pinto és munkatársai (2006) a kerti kakukkfűolaj hatására megjelenő léziókról és az ergoszterin-tartalom csökkenéséről számoltak be *Aspergillus* és dermatofita gombák vizsgálata során, míg de Lira Mota és munkatársai (2012) a kakukkfűolaj ergoszterinnel való kölcsönhatását figyelték meg *R. oryzae*-ben. Fahéjolaj hatására a kezelt *Aspergillus* tenyészetekben degenerált hifákat, citoplazma-kiáramlásokat és a konidiogenezis hiányát figyelték meg. Mindezt az illóolajnak a gomba sejtfalszintézisben résztvevő enzimeivel való kötődésével, vagyis a sejtfalszintézis fahéjolaj általi gátlásával magyarázták (Carmo és mtsai. 2008).

### 3.4. Az extracelluláris enzimek, mint a *Fusarium* keratitisz kialakításában szerepet játszó potenciális virulenciafaktorok

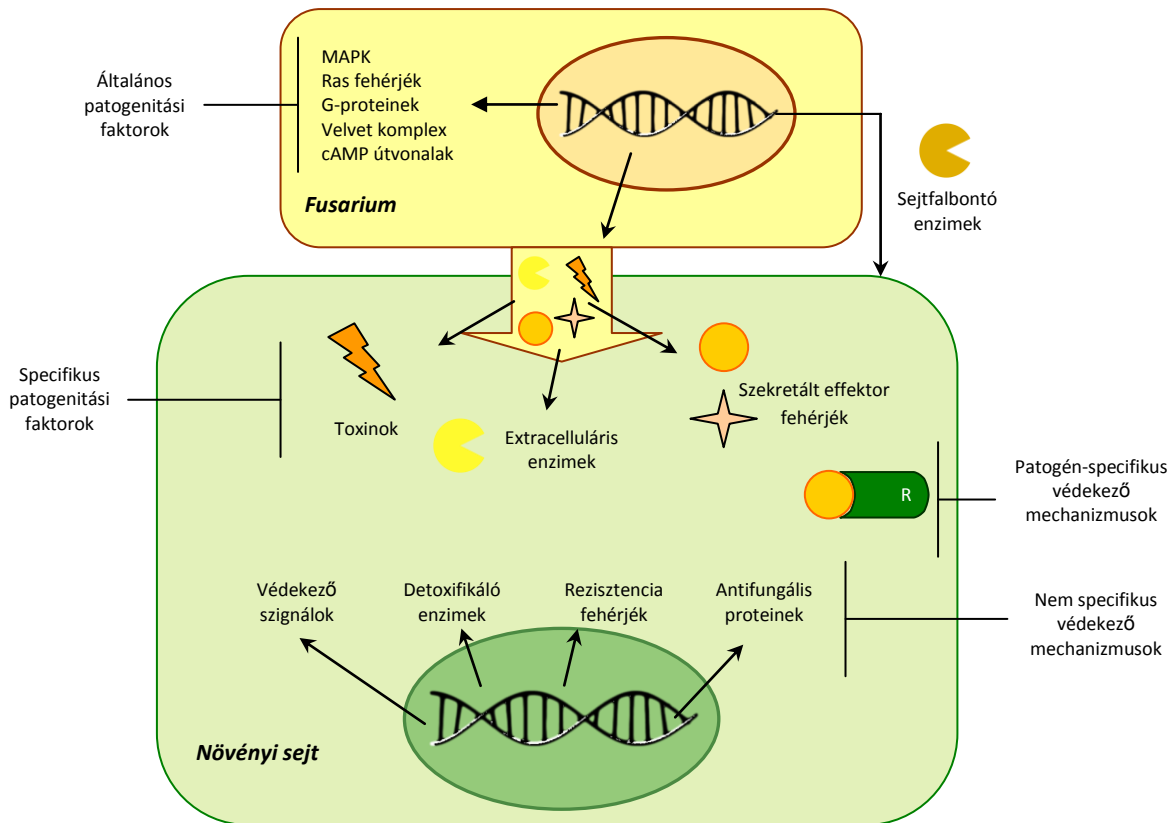
A mikrobiális fertőzések kialakulásának esélyét a gazdaszervezet fokozott érzékenysége (pl. immunszuppresszált állapot, sérülés) mellett a fertőző mikroorganizmus bizonyos celluláris vagy molekuláris jellemzői, ún. virulenciafaktorai határozzák meg. Ezeknek a virulenciafaktoroknak az összessége felelős a mikrobák különböző mértékű megbetegítő-képességéért, a virulenciáért, mely fajonként vagy akár törzsenként is eltérő lehet.

A patogenitás genetikai hátterét vizsgálva Ma és munkatársai (2010) ún. LS (*lineage-specific*, leszármazás-specifikus) régiókat fedeztek fel a növénypatogén *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* izolátum genomjában. Az LS régiók transzpozonokban és olyan eltérő evolúciós eredetű, gazda-patogén kölcsönhatásban szerepet játszó génekben gazdagok, amelyekre a gomba valószínűleg horizontális géntranszfer útján tett szert. Az egymástól genetikai szempontból távolálló törzsek közötti horizontális LS kromoszómatranszfer magyarázattal szolgál a patogenitás és a gazdaspecifitás polifiletikus jellegére (Ma és mtsai. 2010). Habár humánpatogén *Fusarium*-ok esetében hasonló kísérletsorozatot még nem végeztek el, feltételezhető, hogy a humán patogenitásban szerepet játszó, virulenciáért felelős gének is hasonló módon cserélődnek a patogén és nem patogén izolátumok között.

A *Fusarium*-ok patogenitási mechanizmusai alapvetően két csoportra oszthatók: patogén-specifikus és általános mechanizmusok (**2. ábra**, Ma és mtsai. 2013). A specifikus mechanizmusok a nemzetségen belül csak egy vagy néhány fajra jellemzőek: ilyen a toxinok és effektor molekulák termelése. Az általános patogenitási faktorok viszont a patogén gombákra és a *Fusarium*-okra általánosan jellemzőek: ilyenek a szignalizációs útvonalak egyes komponensei, valamint a gazdasejt degradációjában szerepet játszó enzimek is (Ma és mtsai. 2013).

Nelson és munkatársai (1994) a mikotoxinok és extracelluláris enzimek mellett a mesterséges felületeken (pl. katéterek, kontaktlencse) való kitapadás és biofilmképzés képességét említik, mint a *Fusarium*-ok potenciális humán patogenitásban szerepet játszó virulenciafaktorait.





**2. ábra: A *Fusarium*-ok általános és specifikus patogénitási faktorai és az általuk kiváltott védekező mechanizmusok a növényi sejtben (Ma és mtsai. 2013 alapján).**

A nemzetség tagjai, más mikroorganizmusokhoz hasonlóan számos extracelluláris enzim ( $\alpha$ -amiláz, celluláz, elasztáz, keratináz, lipáz, pektináz) termelésére képesek, amelyek a komplex makromolekulákat lebontva könnyen hasznosítható tápanyaghoz juttatják a gombát (Gopal és mtsai. 2013, Mythili és mtsai. 2014, Panneer Selvam és mtsai. 2014). A talajban folytatott szaprofita életmóddal összefüggő lebontó folyamatok mellett ezek az enzimek fontos szerepet játszanak mind a növényi (Voigt és mtsai. 2005, Kikot és mtsai. 2009), mind az állati fertőzések során a szöveti degradációban (Panneer Selvam és mtsai. 2014). Kiryu és munkatársai (1991) egy FSSC izolátum által indukáltak keratitist nyulakban és a szaruhártya sztrómájának inváziója során elektronmikroszkóp segítségével a gombafonalak körül a kollagén fibrillumok emésztését figyelték meg. Panneer Selvam és munkatársai (2014) 68 humán keratitiszből izolált *Fusarium* törzs *in vitro* extracelluláris enzimaktivitási profilját határozták meg és vetették össze az általuk okozott fertőzések legfőbb klinikai jellemzőivel (tünetek, a betegség súlyossága és végkimenetele, a kezelés ideje, műtéti beavatkozás szükségessége). Megfigyeléseik alapján az extracelluláris keratináz, elasztáz és DNáz aktivitásnak csekély szerepe van a *Fusarium* keratitisz klinikai képének kialakításában. Ezzel szemben összefüggést találtak a proteáz és lipáz aktivitás, valamint a betegség súlyossága

között (Panneer Selvam és mtsai. 2014). Gopinathan és munkatársai (2001) egy szaruhártyagyulladásból izolált FSSC törzs extracelluláris proteáz termelését vizsgálták *in vitro* és *in vivo* körülmények között. Kimutatták, hogy a vizsgált izolátum *in vitro* körülmények között, a kollagén mint egyedüli nitrogénforrás jelenlétében extracelluláris szerin-proteázokat termel. Ezt az aktivitást az izolátummal fertőzött szaruhártyából *in vivo* már nem tudták kimutatni. Eredményeik alapján a gomba proteolitikus enzimeinek nincs közvetlen szerepe a szaruhártya szöveti degradációjában. Feltételezik, hogy a fertőzött szövet inváziója során a gomba annyira kis mennyiségű szerin-proteázt termel, amelyet a vizsgálatok során nem tudtak kimutatni, de szerepet játszhat a szaruhártyasejtek vagy az inflammatórikus sejtek proteínáz-termelésének kiváltásában, aktiválásának folyamatában.

#### 4. CÉLKITŰZÉSEK

Dél-Indiában a *Fusarium* nemzetség képviselői a humán szaruhártya-gyulladás leggyakoribb kórokozói között szerepelnek. A különböző *Fusarium* fajkomplexumok és azokon belül az egyes fajok is eltérő antifungális érzékenységet mutathatnak. A jelenleg rendelkezésre álló terápiás stratégiák alkalmazása ellenére a kezelés a regisztrált esetek mintegy egyharmadában továbbra is sikertelennek bizonyul. Az új, hatékonyabb kezelési módok kidolgozása érdekében kiemelten fontos a kórokozók minél alaposabb ismerete.

Mindezek alapján az alábbi célokat tűztük ki:

- **2010-2011 folyamán humán keratomikózisból izolált *Fusarium* törzsek (legalább) fajkomplexum-szintű meghatározása molekuláris módszerek alkalmazásával.** A klinikai gyakorlatban alkalmazott morfológiai alapú azonosítási módszerek időigényesek és sokszor nem teszik lehetővé a pontos, fajszintű meghatározást. Ezzel szemben a molekuláris módszerek általában gyorsabb és pontosabb eredményeket szolgáltatnak. A keratomikózisból származó *Fusarium* izolátumok molekuláris alapon történő meghatározásához fajkomplexum-szinten a *TUB* és *TEF1* gének szekvenciárészleteit használjuk.
- **Egy, az FSSC tagjaira specifikus, gyors, molekuláris azonosítási módszer kidolgozása.** Az FSSC nemcsak a *Fusarium* keratitiszért, hanem a világszerte regisztrált fuzáriózisok túlnyomó többségéért is felelős fajkomplexum. Egy egyszerű, gyors és specifikus módszer jelentősen meggyorsíthatja az azonosítás folyamatát és lerövidítheti az FSSC-specifikus terápia megkezdéséig eltelt időt.
- **A klinikai izolátumok közti filogenetikai kapcsolatok vizsgálata.** A filogenetikai analízis az izolátumok közötti leszármazási kapcsolatok feltérképezése mellett a fajazonosítási eredmények ellenőrzésére is alkalmas. Munkánk során a molekuláris módszerrel meghatározott *Fusarium* izolátumok filogenetikai kapcsolatait a *TEF1* és a *TUB* gének szekvenciárészletei alapján *Maximum Likelihood* és Bayes-féle analízissel becsüljük meg.
- **Az izolátumok *in vitro* antifungális szerek iránti érzékenységének vizsgálata és egy lehetséges, kombinált terápia *in vitro* tesztelése.** A klinikai mintákból származó *Fusarium*-ok (különösen az FSSC tagjai) gyakran rezisztenciát mutatnak a klinikumban széles körben használatos antimikotikumokkal szemben. A keratitiszből származó *Fusarium* izolátumok antifungális szerek iránti *in vitro* érzékenységének meghatározásával, valamint a leghatásosabbnak bizonyuló, de eltérő

hatásmechanizmusú antifungális szerek között fellépő lehetséges kölcsönhatások vizsgálatával várhatóan javaslatot tudunk tenni egy, a *Fusarium* keratitisz kezelésében biztonságosan alkalmazható egyszerű vagy kombinált terápiára.

- **Illóolajok *in vitro* antifungális hatásának vizsgálata a különböző fajkomplexumok képviselőivel szemben.** A *Fusarium* fajoknak a legtöbb ma használatos antifungális szerrel szemben tapasztalt rezisztenciája miatt egyre sürgetőbbé válik egy új alternatív gyógymód kifejlesztése. Az illóolajok, illetve fő komponenseik alapot szolgáltathatnak egy új gyógyszerhatóanyag, így egy alternatív terápiás eljárás kifejlesztéséhez.

- **A leghatékonyabb illóolaj fő komponense és a NTM *in vitro* kombinációjának *Fusarium* izolátumokra gyakorolt hatásának, valamint a hatóanyagok között fellépő kölcsönhatásoknak a vizsgálata.** Indiában a NTM a *Fusarium* keratitisz kezelésére leggyakrabban alkalmazott szerek egyike. Más antifungális hatású készítményekkel történő kombinált alkalmazása hatékonyabbá teheti a terápiát, lerövidítheti a kezelés idejét.

- **Klinikai és környezeti izolátumok extracelluláris enzimaktivitásainak vizsgálata és összehasonlítása.** A *Fusarium*-ok által szekretált enzimek lehetséges virulenciafaktorok, melyek segíthetik a szem szöveti degradációját a fertőzés során. A klinikai és környezeti izolátumok enzimaktivitásainak összehasonlító vizsgálata adatokat szolgáltat a humán fertőzés kialakításában szerepet játszó enzim(ek)ről. Egy sikeresen azonosított, *Fusarium* keratitiszben szerepet játszó extracelluláris enzim tanulmányozása nemcsak a patomechanizmus megértését segítheti, hanem annak specifikus gátlószerét adjuváns szerként alkalmazva a betegség kezelését is gyorsabbá és hatékonyabbá tehetné.

## 5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 5.1. A kísérletekben szereplő gombatörzsek: izolálás, tenyésztés, fenntartás

Munkánk során összesen 142 - 88 indiai klinikai forrásból, 19 indiai talajból, 25 növényekről és további 10 egyéb forrásból származó - *Fusarium* izolátummal dolgoztunk. A kísérletek során felhasznált valamennyi törzset, illetve az azokhoz tartozó legfontosabb információkat az **1. sz. melléklet** foglalja össze. Az izolátumok tenyésztése minden esetben oxitetraciklinnel és eritromicinnel kiegészített burgonya-dextróz agar (PDA) táptalajon történt. A tiszta tenyészeteket felhasználásukig szintén PDA táptalajon tartottuk fenn.

A klinikai törzsek mindegyikét az *Aravind Eye Hospital & Postgraduate Institute of Ophthalmology* (Coimbatore, Tamilnadu, India) mikrobiológiai laboratóriumában izolálták 2010 és 2011 folyamán, szaruhártya-fertőzésekben. Az érintett szem(ek)ről vett szaruhártyamintákat véres agaron (*sheep's blood agar 5%*, SBA, Himedia Laboratories, Mumbai, India) és csokoládé agaron (CA, Himedia Laboratories, Mumbai, India) 37 °C-on, illetve PDA táptalajon és agy-szív infúziós (*brain heart infusion*, BHI, Himedia Laboratories, Mumbai, India) tápoldatban 27 °C-on inkubálták. A tenyészetek környezeti kontaminációjának kizárása érdekében csak a legalább két különböző tápközegen is növekedő mikroorganizmusokat tekintették a szaruhártya-fertőzésért felelős ágensnek. A pozitív tenyészeteket makro- és mikromorfológiai tulajdonságaik alapján azonosították. *Fusarium*-ok esetében ez legfeljebb nemzetségszintű azonosítást jelentett.

2012 októbere és decembere között a Coimbatore-ban és környékén, valamint Dél-India művelt mezőgazdasági területein gyűjtött talaj- és növényi mintákból izoláltunk *Fusarium*-okat. Ehhez diklorán-bengálvörös-kloramfenikol agart (*Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar*, DRBCA, Himedia Laboratories, Mumbai, India) alkalmaztunk. A talajmintákból 1 g/ml-es törzsoldatot készítettünk steril desztillált vízben. Majd a törzsoldatok százszoros és ezerszeres hígításaiból 100-100 µl-t szélesztettünk ki DRBCA csészékre. A növényi részeket a csészékre történő leoltás előtt 5 percen át 90%-os etanolban áztatva sterilizáltuk, majd 1 percen át steril desztillált vízben mostuk. Leoltás után a mintákat szobahőmérsékleten inkubáltuk. A DRBCA-n makromorfológiai bélyegek alapján *Fusarium*-nak adódó telepeket PDA táptalajon tartottuk fenn a további kísérletek megkezdéséig.

A kísérletek során felhasznált, nem általunk izolált, növényi mintából származó *Fusarium*-okat a *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS, Utrecht, Hollandia), a *Szeged Microbiological Collection* (SZMC, Szeged, Magyarország) és a *The Microbial Type Culture Collection and Gene Bank* (MTCC, Chandigarh, India) törzsgyűjtemények biztosították.

## 5.2. Alkalmazott tápközegek, pufferek, oldatok és reagensek

### Agaróz gélelektroforézishez használt anyagok:

*TAE puffer*: 40 mM Tris-ecetsav (pH 7,6); 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA.

*Agaróz gél*: 1% (w/v) agaróz (Lonza) TAE pufferben oldva.

*DNS festék*: 1×*SYBR Safe* (Thermo Fisher Scientific).

*DNS molekulásúly marker* (a várt termék méretétől függően): *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific); *pUC Mix Marker* (Thermo Fisher Scientific).

### Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokhoz alkalmazott anyagok:

*Fluoreszcens festékek*:

5 µM *FUN1* (Thermo Fisher Scientific) HEPES-ben oldva.

*Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* (Sigma-Aldrich): 1% *Annexin V-FITC* és 2% propídium jodid (PI) 1x *Binding Buffer*-ben oldva.

*HEPES*: 10 mM Na-HEPES (Sigma-Aldrich); pH 7,2.

*HEPES-glükóz*: 2% (w/v) D-glükóz; 10 mM Na-HEPES (Sigma-Aldrich); pH 7,2.

*MM (minimal medium/minimál tápoldat)*: 1% (v/v) sóoldat; 1% (w/v) D-glükóz; 0,085% (w/v) NaNO<sub>3</sub>.

*Sóoldat*: 26 g/l KCl; 26 g/l MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O; 76 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5% (v/v) nyomelemoldat.

*Nyomelemoldat*: 40 mg/l Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>×10H<sub>2</sub>O; 400 mg/l CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O; 714 mg/l FePO<sub>4</sub>; 728 mg/l MnSO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O; 800 mg/l Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O; 8 mg/l ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O.

### Tápközegek:

*Burgonya-dextróz agar* (PDA, *potato dextrose agar*, Difco): 0,4% (w/v) burgonyakivonat; 2% (w/v) D-glükóz; 2% (w/v) agar; pH 5,6.

*Burgonya-dextróz tápoldat* (PDB, *potato dextrose broth*, Difco): 0,4% (w/v) burgonyakivonat; 2% (w/v) D-glükóz.

*RPMI 1640* (Sigma-Aldrich) 0,3 mg/l L-glutaminnal kiegészítve, 0,165 M 4-morfolinpropánszulfonsav (MOPS, Sigma-Aldrich), pH 7,0.

*Specifikus tápközegek extracelluláris enzimaktivitások vizsgálatához:*

*Celluláz:* 0,01% (w/v) kongóvörös festék; 0,1% (w/v) *Yeast Nitrogen Base* (Difco); 0,5% (w/v) karboximetil-cellulóz (Sigma-Aldrich); 1,5% (w/v) agar; pH 6.

*Elasztáz:* 0,05% (w/v) elasztin; 0,05% (w/v) *Yeast Carbon Base* (Difco); 0,1% (v/v) bengálvörös festék (5% w/v); 0,05 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (pH 7,6); 1,5% (w/v) agar.

*Foszfolipáz:* 0,55% (w/v) CaCl<sub>2</sub>, 1% (w/v) pepton; 2% (w/v) agar; 2% tojássárgája; 4% (w/v) D-glükóz; 5,84 % (w/v) NaCl; pH 7.

*Kazeináz:* 1% (w/v) sovány tejpor; 2% (w/v) agar.

*Keratináz:* 0,003% (w/v) CuSO<sub>4</sub>; 0,01% (w/v) FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O; 0,01% (w/v) ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O; 0,05% (w/v) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,05% (w/v) KCl; 0,05% (w/v) MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O; 0,4% (w/v) keratin azúr (Sigma-Aldrich); pH 7.

*Lipáz:* 0,1% (v/v) tributirin; 0,3% (w/v) élesztőkivonat; 0,5% (w/v) pepton; 1% (w/v) agar; pH 7.

*Pektináz:* 0,003% (w/v) CuSO<sub>4</sub>; 0,01% (w/v) FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O; 0,01% (w/v) ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O; 0,05% (w/v) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,05% (w/v) KCl; 0,05% (w/v) MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O; 0,5% (w/v) pektin; 2,5% (w/v) agar; pH 6.

### 5.3. Alkalmazott antifungális szerek

A kísérletek során alkalmazott antifungális szereket és az azokkal kapcsolatos legfontosabb tudnivalókat a **2. táblázat** összegzi. Ezek között szerepel 4, Indiában kereskedelmi forgalomban kapható szemcsepp, melyeket a tesztek során kész törzsoldatként kezeltünk, a szükséges további hígításokat közvetlenül ezekből készítettük. A por alakban rendelkezésünkre álló antifungális szerekből 96%-os etanollal készítettünk 10 mg/ml koncentrációjú törzsoldatokat.

#### 2. táblázat: A kísérletek során felhasznált antifungális szerek.

Antifungális szer (Termék neve)	Rövidítés	Gyártó (Származási ország)	Koncentráció (w/v)
<b>POROK</b>			
Amfotericin B deoxikolát (Amfocare)	AMB	Medispec Pharmaceuticals Pvt. Ltd. (India)	-
Terbinafin	TRB	Sigma-Aldrich (USA)	-
Vorikonazol (Vfend)	VRC	Pfizer Inc. (India)	-
<b>SZEMCSEPPEK</b>			
Ekonazol (Aurozole)	ECN	Aurolab (India)	2%
Itrakonazol (Itral)	ITC	Jawa Pharmacheuticals (India)	1%
Klotrimazol (Auroclot)	CLT	Aurolab (India)	1%
Natamicin (Natamet)	NTM	Sun Pharmaceutical Ind. Ltd. (India)	5%

#### 5.4. Alkalmazott illóolajok, illóolaj-komponensek

A munkánk során felhasznált illóolajokat, valamint azok főbb jellemzőit a **3. táblázat** foglalja össze. Az Aromax Zrt.-től származó illóolajok összetételét a gyártó határozta meg gázkromatográfiás elválasztással kombinált tömegspektrometriával (GC-MS). A Dél-India Tamilnadu államában vásárolt, ismeretlen eredetű illóolajok GC-MS analízisét és ezzel együtt az olajok valóságának igazolását Dr. Böszörményi Andrea, a Semmelweis Egyetem Farmakognóziai Intézetének munkatársa végezte el, az alábbiak szerint:

10 µl illóolajat 1 ml n-hexánban oldott 1,5 ml térfogatú mintatartó üvegben. Az oldatból 1 µl térfogatot injektált CTC Combi PAL (CTC Analytics AG) automata mintaadagoló segítségével, *split* módban. Az injektor hőmérséklete 250 °C a *split* arány 1:20 volt. Az analízis Agilent 6890N/5973N GC-MSD készülékkel, Supelco SLB-5MS kapilláris kolonnán (30 m × 250 µm × 0,25 µm) történt. A kolonna hőmérséklete egy 3 perces izoterm szakasz után 60-200 °C-ra emelkedett 8 °C/perc sebességgel, majd 2 perc izoterm szakasz után 200-230 °C-ra, 10 °C/perc sebességgel, végül 5 perc izoterm szakasz után 230-250 °C-ra 10 °C/perc sebességgel, a végső hőmérsékletet 1 percre tartotta. A vivőgáz nagy tisztaságú, 6.0 hélium, az áramlási sebesség 1,0 ml/perc (37 cm/s) volt, *constant flow* módban. A detektálás *quadrupole* tömegszelektív detektorral történt, elektronionizációs (70 eV), teljes *scan* módban (41-500 amu, 3,2 scan/s). Az adatokat MSD ChemStation D.02.00.275 software (Agilent) segítségével értékelte ki. A kvantitatív azonosítás során a komponensek retencióidőjét és tömegspektrumait standardok és a NIST 05 könyvtár adataival hasonlította össze, a százalékos értékelést terület-normalizációval végezte el.

Célkitűzéseinket követve az általunk vizsgált illóolajok közül csak a leghatékonyabbnak bizonyuló olaj főbb komponenseinek antifungális hatását vizsgáltuk a tesztek során. Esetünkben a fahéj olaj a többi illóolajhoz viszonyítva kiemelkedő antifungális hatásának bizonyult, így a tesztek során egyedül ennek az olajnak a fő komponensét, a fahéjaldehidet (Sigma-Aldrich, Tisztaság > 99%, Sűrűség: 1,05 g/ml) vizsgáltuk (**3. táblázat**).

Az illóolajokból 1% Tween 40-nel (Sigma-Aldrich) kiegészített RPMI 1640 tápoldattal 512 µl/ml, a fahéjaldehidből pedig 50 µl/ml koncentrációjú törzsoldatokat készítettünk.



**3. táblázat: A kísérletek során felhasznált illóolajok, származási helyük és összetételük.**

Illóolaj (Botanikai elnevezés)	Gyártó (Származási ország)	Sűrűség (g/ml)	Összetevők	Százalékos arány (%)	GC-MS kromatogram
<b>Borókaolaj</b> ( <i>Juniperus communis</i> L.)	Aromax Zrt. (Magyarország)	0,86	α-pinén β-pinén o-cimén	40,7 36,0 18,9	<b>2/a. melléklet</b>
<b>Citromolaj</b> ( <i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.)	Aromax Zrt. (Magyarország)	0,8	Limonén β-pinén γ-terpinén	83,2 9,5 5,6	<b>2/b. melléklet</b>
<b>Citromos eukaliptuszolaj</b> ( <i>Eucalyptus citriodora</i> Hook. K.D. Hill & L.A.S. Johnson)	Ismeretlen (Tamilnadu, India)	0,9	α-pinén β-pinén 1,8 cineol Citronellal Izopulegol Izoizopulegol Citronellol citronellil-acetát β-kariofillén citronellal-származék	0,5 0,7 2,1 76,9 6,6 0,8 5,9 1,8 2,4 1,5	<b>2/c. melléklet</b>
<b>Fahéjolaj</b> ( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume)	Aromax Zrt. (Magyarország)	1,0	Fahéjaldehid cinnamil acetát	93,1 2,5	<b>2/d. melléklet</b>
<b>Kakukkfűolaj</b> ( <i>Thymus vulgaris</i> L.)	Aromax Zrt. (Magyarország)	0,9	Timol o-cimén γ-terpinén	51,8 31,7 6,2	<b>2/e. melléklet</b>
<b>Kúszó fajdbogyóolaj*</b> ( <i>Gaultheria procumbens</i> )	Ismeretlen (Tamilnadu, India)	1,2	metil-szalicilát	100	<b>2/f. melléklet</b>
<b>Majorannaolaj</b> ( <i>Origanum majorana</i> L.)	Aromax Zrt. (Magyarország)	0,9	terpinén-4-ol γ-terpinén β-fellandrénn	33,6 19,5 8,0	<b>2/g. melléklet</b>
<b>Muskotályzsályaolaj</b> ( <i>Salvia sclarea</i> L.)	Aromax Zrt. (Magyarország)	0,9	linalil acetát Linalool	84,0 13,6	<b>2/h. melléklet</b>
<b>Teafaolaj</b> ( <i>Melaleuca alternifolia</i> (Maiden & Betche) Cheel)	Ismeretlen (Tamilnadu, India)	0,9	α-pinén p-cimol 1,8 cineol terpinén-4-ol α-terpineol nem-terpén összetevő allo-aromadendrénn	2,2 32,2 10,0 46,1 2,4 3,6 1,3	<b>2/i. melléklet</b>

\* A kúszó fajdbogyóolaj 100%-os metil-szalicilát tartalma utalhat az illóolaj szintetikus előállítására.

## 5.5. Módszerek

### 5.5.1. *Fusarium* izolátumok azonosítása molekuláris módszerekkel

#### 5.5.1.1. Szekvenciaalapú azonosítás

Az általunk vizsgált *Fusarium* izolátumokat mindenekeelőtt a *TUB* és *TEF1* gének szekvenciárészletei alapján azonosítottuk: a fenti génszakaszokra tervezett specifikus indítószekvenciákkal PCR-t hajtottunk végre, a keletkező amplikonok bázissorrendjének meghatározása után internetes adatbázisok homológiaKERESŐ programjaival kerestünk egyezést a kapott szekvenciákkal.

**Genomi DNS tisztítása.** A genomi DNS tisztításához az izolátumokat PDB tápoldatban, 25 °C-on, 5 napon keresztül, 200 rpm-en rázatva neveltük. A folyékony tápközegben felszaporított gomba micéliumot leszűrtük, majd desztillált vízzel mostuk. A micéliumot -70 °C-on lefagyasztottuk, majd 16 órán keresztül liofileztük. A liofilizált micéliumokat dörzsmozsárban porítottuk és a későbbi felhasználásig -20 °C-on tároltuk. A DNS tisztítását az Epicentre cég által gyártott *Master Pure™ Yeast DNA Purification Kit* felhasználásával, a gyártó útmutatásait követve végeztük el.

**PCR.** Az izolátumok molekuláris azonosítása érdekében elvégeztük a *TUB* és *TEF1* gének PCR-rel történő amplifikálását. A reakcióelegyek összetételét a **4. táblázat**, a reakciókörülményeket az **5. táblázat**, míg az egyes génszakaszokra specifikus indítószekvenciákat a **6. táblázat** foglalja össze.

#### 4. táblázat: A PCR során összemért reakcióelegyek összetétele µl-ben kifejezve.

Összetevők	FSSC specifikus PCR	<i>TEF1</i>	<i>TUB</i>
dNTP oldat	4 (2,5 mM)	5 (2 mM)	5 (2 mM)
Specifikus primer*	1-1 (10 µM)	1-1 (10 µM)	1-1 (10 µM)
10× Dupla-Taq™ puffer (ZenonBio)	5	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub> oldat (ZenonBio)	5 (25 mM)	2,5 (25 mM)	2,5 (25 mM)
Dupla-Taq™ DNS-polimeráz (ZenonBio)	0,3 (1,5 U)	0,3 (1,5 U)	0,3 (1,5 U)
Bidesztillált víz	32,7	12	12
Templát DNS (5-50 ng/µl)	1	1	1
Végtérfogat	50	25	25

\* A különböző PCR-ek során használt specifikus indítószekvenciákat a 6. táblázat tartalmazza.

## 5. táblázat: A PCR során alkalmazott reakciókörülmények.

Lépések	FSSC specifikus PCR	<i>TEF1</i>	<i>TUB</i>
1. Elődenaturáció	2 perc, 95 °C	3,5 perc, 94 °C	3,5 perc, 94 °C
2. Denaturáció	1 perc, 95 °C	1 perc, 94 °C	1 perc, 94 °C
3. Primer kötődés	1 perc, 50 °C	30 s, 53 °C	30 s, 60 °C
4. Polimerizáció	2 perc, 72 °C → 2. lépés 30×	1 perc, 72 °C, dt[s]=3 → 2. lépés 33×	2 perc, 72 °C → 2. lépés 35×
5. Utópolimerizáció	10 perc, 72 °C	7 perc, 72 °C	5 perc, 72 °C

## 6. táblázat: A PCR-hez és szekvenáláshoz használt primerek.

Lókuszt	Primer	Szekvencia	Referenciák
<i>CYTB</i> *	fFuso1	5'-CTC TGT TAA TAA TGC AAC TC-3'	He és mtsai. 2011
	rFuso2	5'-TGG TAC TAT AGC TGG AGG A-3'	
<i>TEF1</i>	Ef1	5'-ATG GGT AAG GA(A/G) GAC AAG AC-3'	O'Donnell és mtsai. 1998
	Ef2	5'-GGA (G/A)GT ACC AGT (G/C)AT CAT GTT-3'	
<i>TUB</i>	Fu2	5'-GGT CGC CGT AAG AGG GGT TGG-3'	Chung és mtsai. 2008
	Fu3	5'-CGA GCC CGG TAC CAT GGA CG-3'	

\*A mitokondriális citokrom B (*CYTB*) géntervezett FSSC specifikus primerek.

**Agaróz gélelektroforézis.** A PCR-termékeket 1%-os, *SYBR Safe*-fel (Invitrogen) festett agaróz gélen futtattuk 5-10 V/cm feszültség mellett horizontális gélelektroforézis készülék segítségével. A géleket ultraibolya fényel megvilágítva vizsgáltuk és fényképeztük. A gélek kiértékelése UVP géldokumentációs rendszerrel és az ehhez csatlakozó *GelBase* szoftverrel történt.

**DNS-szekvenálás és szekvenciaelemzés.** Az amplikonok bázissorrendjének meghatározását a német LGC Genomics cég munkatársai végezték. A szekvenogramok kiértékeléséhez a BioEdit v. 7.1.3.0 (Hall 1999) programot használtuk.

**Azonosítás.** A *TEF1* és *TUB* génszakaszok nukleotidszekvenciája alapján az izolátumok meghatározását a *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, [blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)), a FUSARIUM-ID ([isolate.fusariumdb.org](http://isolate.fusariumdb.org)) és a *Fusarium* MLST ([www.cbs.knaw.nl/Fusarium](http://www.cbs.knaw.nl/Fusarium)) honlapján található *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) homológia-kereső program segítségével végeztük el.

### 5.5.1.2. *Fusarium solani* fajkomplexumhoz tartozó törzsek specifikus, PCR-alapú azonosítása

A 2010-2012 között izolált *Fusarium*-ok azonosítási eredményeit egy további, PCR-alapú módszerrel is megerősítettük, melyet He és munkatársai (2011) írtak le a közelmúltban.

A reakcióelegyek összetételét a **4. táblázat**, a reakciókörülményeket az **5. táblázat**, míg az egyes génszakaszokra specifikus indítószekvenciákat a **6. táblázat** foglalja össze.

A reakció az FSSC izolátumok esetében egy ~330 bp méretű amplikont eredményez.

### 5.5.1.3. A *TEF1* szekvencia hasítása *EcoRI* restrikciós endonukleázzal

Az emésztési reakciókat a 70 indiai klinikai *Fusarium*, valamint - negatív kontrollként - 10 további *Fusarium* izolátum *TEF1* PCR-termékével mértük össze. A reakcióelegyek összetétele a következő volt: 10 µl *TEF1* PCR-amplikon (0,1-0,5 µg DNS), 18 µl steril bidesztillált víz, 2 µl 10× *EcoRI* puffer (Thermo Fisher Scientific), 20 U *EcoRI* (Thermo Fisher Scientific). A mintákat 37 °C-on 16 órán át inkubáltuk, majd 1%-os, *SYBR Safe*-fel (Invitrogen) festett agaróz gélen futtattuk és vizualizáltuk az **5.5.1.1. pontban** leírtak alapján. Az emésztési reakciókat *FastDigest*® *EcoRI* (Thermo Fisher Scientific) restrikciós endonukleázzal is megismételtük a gyártó előírásait követve. Ebben az esetben a reakcióelegyeket 30 percen át 37 °C-on inkubáltuk.

### 5.5.2. Klinikai *Fusarium* izolátumok filogenetikai analízise

A klinikai izolátumok közötti filogenetikai kapcsolatok rekonstrukcióját a *TEF1* és *TUB* szekvenciák alapján végeztük el. Ehhez a szekvenciákat fasta formátumba exportáltuk. Külcsoportként egy *Fusarium cerealis* törzset (*Northern Regional Research Laboratory, Agricultural Research Service Culture Collection*, Peoria, USA, NRRL 25805) alkalmaztuk, a hozzá tartozó AF212466 azonosítószámú *TEF1* szekvenciát az NCBI adatbázisából töltöttük le. A ClustalX 2.0.11 szoftver (Larkin és mtsai. 2007) segítségével egygénes és kombinált illesztéseket készítettünk. A kapott illesztéseket a BioEdit v. 7.1.3.0 (Hall 1999) programban kézzel szerkesztettük. A filogenetikai analízis során alkalmazott, a szekvenciákhoz legjobban illeszkedő nukleotid-szubsztitúciós modellt a jModelTest AIC<sub>c</sub> (*corrected Akaike Information Criterion*, korrigált Akaike információs kritérium) funkciójának segítségével állapítottuk meg (Posada és Crandall 1998).

A *Maximum Likelihood bootstrap* analízishez a PhyML 3.0 szoftver *NNI* (*nearest neighbour interchange*) *branch swapping* (legközelebbi szomszéd ág csere) algoritmusát és a TVM+G evolúciós modellt használtuk, 1000 ismétlésen keresztül (Guindon és Gascuel 2003). Szignifikánsnak a >69% *bootstrap* értékeket tekintettük (Soltis és Soltis 2003).

A Bayes-féle analízishez a MrBayes 3.1.2 szoftvert (Huelsenbeck és Ronquist 2001) használtuk. A Markov-láncokat (összesen 8 lánc: 2 párhuzamos futásban 4-4) 10 millió generáción keresztül futtattuk, a *burn-in* értéket 80000-re állítva, minden 100. generációban történő mintavételezéssel, a GTR+G evolúciós modell segítségével. A Tracer v1.4 programmal (Rambaut és Drummond 2007) ellenőriztük, hogy az értékek konvergáltak-e a

valós poszterior eloszláshoz. Szignifikánsnak tekintettük a legalább 0,95 vagy az a feletti poszterior valószínűséget. A *post-burn-in* fákból 50% többségi konszenzus filogramot generáltunk a MrBayes program segítségével.

### 5.5.3. Antifungális szerek iránti érzékenység vizsgálata

#### 5.5.3.1. Antimikrobiális tesztek mikrodilúcióval

A kísérletek során összesen 70 klinikai *Fusarium* izolátum 7 konvencionális antifungális szer (AMB, ECN, ITC, CLT, TRB, NTM, VRC, **2. táblázat**) iránti érzékenységét határoztuk meg a CLSI M38-A2 szabvány előírásainak megfelelően, *in vitro* mikrodilúciós teszttel (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008).

**Inokulumkészítés.** Az egyes izolátumok konídium-szuszpenzióinak elkészítéséhez a ferde agaron lévő tenyészetekre 5-5 ml RPMI 1640 tápoldatot mértünk. A telepekről folyamatos keverés mellett lemostuk a konídiumokat, a kapott szuszpenziót steril vattán átszűrtük. A konídiumszámot Bürker-kamra segítségével határoztuk meg, majd a szuszpenzióból  $1 \times 10^5$  konídium/ml koncentrációjú hígítást készítettünk RPMI 1640 tápoldattal.

**A mikrodilúciós teszt összemérése.** Mindenekelőtt a tesztelendő antifungális szerek törzsoldatából 10 lépcsős felező hígítási sort (128-0,25  $\mu\text{g/ml}$ ) készítettünk. Az egyes anyagok *in vitro* antimikrobiális hatását 96 lyukú mikrotiterlemezen vizsgáltuk. Minden mintahely 100  $\mu\text{l}$   $1 \times 10^5$  konídium/ml szuszpenziót és 100  $\mu\text{l}$  tápoldatban oldott, adott koncentrációjú antimikotikumot tartalmazott. Növekedési kontrollként 100  $\mu\text{l}$  tápoldatot és 100  $\mu\text{l}$   $1 \times 10^5$  konídium/ml szuszpenzió elegyét alkalmaztuk. Szer steril kontrollként 100  $\mu\text{l}$  adott koncentrációjú antimikotikumhoz 100  $\mu\text{l}$  tápoldatot mértünk, a tápoldat steril kontrolljaként pedig 200  $\mu\text{l}$  RPMI 1640-t vittünk fel a mikrotiterlemezre. Kísérleteinket három párhuzamos leoltással végeztük el. A mikrotiterlapokat 37 °C-on inkubáltuk. A méréseket 0, 24, 48 és 72 óra elteltével, 620 nm hullámhosszúságú fény abszorbanciájával végeztük el (Jupiter HD univerzális mikrotiterlemez-leolvasó interferenciaszűrővel, ASYS Hitech GmbH).

**Kiértékelés.** Az egyes anyagok antimikrobiális hatását az adott szer alkalmazása során bekövetkezett növekedésgátlás mértékével jellemeztük. A növekedési kontrollhoz tartozó fényelnyelés mértékét vettük 100%-os növekedésnek minden izolátum esetében, és ehhez viszonyítottuk az antifungális szert tartalmazó minta fényelnyelését, ami alapján növekedési százalékot számítottunk. Végül meghatároztuk a MIC- (*minimal inhibitory concentration*, minimális gátló koncentráció) értékeket. MIC-értéknek az alkalmazott antifungális szer azon

koncentrációját vettük, amely 48 óra elteltével a vizsgált izolátum növekedését legalább 90%-ban gátolta.

### 5.5.3.2. Hatóanyag-kombinációk iránti érzékenység vizsgálata

A kombinációs tesztek során összesen 42 *Fusarium* izolátum *in vitro* érzékenységét határoztuk meg a TRB és NTM kombinációi iránti, ún. *checkerboard* titrálással (Eliopoulos és Moellering 1996). Az előzőekben leírtaknak megfelelően ebben az esetben is 3 párhuzamosban, mintahelyenként 200 µl végtérfogatban végeztük el a kísérleteket, a korábbiakhoz képest azonban ezúttal egy mintahely 50-50 µl tápoldatban oldott, adott koncentrációjú hatóanyagot, valamint 100 µl  $1 \times 10^5$  konídium/ml koncentrációjú konídium-szuspenziót tartalmazott. Az alkalmazott módszernek köszönhetően az egyes mintahelyek a vizsgált hatóanyagok különböző hígításainak más-más kombinációit tartalmazták.

A tesztekhez a TRB és NTM törzsoldatából RPMI 1640 tápoldattal felező hígítási sort készítettünk. A mikrotiterlapon elért végső koncentráció-tartomány a NTM esetében 0,125-256 µg/ml volt, a TRB esetében pedig 0,06-128 µg/ml.

**Kiértékelés.** Ahhoz, hogy a két hatóanyag közötti kölcsönhatás típusát megállapíthassuk, ún. frakcionális gátló koncentráció index (*fractional inhibitory concentration index*, FICI) értékeket számítottunk (Johnson és mtsai. 2004):

$$FICI = FIC_A + FIC_B = \frac{MIC_{A\_kombinációban}}{MIC_{A\_egyedül}} + \frac{MIC_{B\_kombinációban}}{MIC_{B\_egyedül}},$$

ahol  $MIC_{A\_egyedül}$  és  $MIC_{B\_egyedül}$  A és B anyag MIC-értéke az adott szer egyedüli alkalmazása esetén,  $MIC_{A\_kombinációban}$  és  $MIC_{B\_kombinációban}$  az A és B szer kombinált alkalmazásakor megfigyelt MIC-értéket jelöli, míg a  $FIC_A$  és  $FIC_B$  az A és B anyag kombinált alkalmazásakor megfigyelt MIC-értékek és az egyedüli alkalmazásakor megfigyelt MIC-értékek hányadosa. A két szer között fellépő kölcsönhatás szinergizmusnak tekinthető, ha  $FICI < 0,5$ , antagonizmusnak ha  $FICI > 4$ , illetve nincs kölcsönhatás a két hatóanyag között, ha  $0,5 < FICI \leq 4$  (Odds 2003).

### 5.5.4. Klinikai *Fusarium* izolátumok illóolajok iránti érzékenységének vizsgálata

#### 5.5.4.1. Antimikrobiális tesztek mikrodilúcióval

Az 5.7. pontban leírtakhoz hasonlóan összesen 9 illóolaj (3. táblázat) és a leghatékonyabbnak bizonyuló olaj fő komponensének *Fusarium*-okkal szembeni növekedésgátló hatását vizsgáltuk *in vitro* mikrodilúciós teszttel. A kísérletekben szereplő 18

indiai klinikai izolátum kiválasztásának fő szempontja az volt, hogy a *Fusarium* keratitisszel eddig összefüggésbe hozott valamennyi fajkomplexum (FDSC, FIESC, FFSC, FOOSC, FSSC) képviseltetve legyen.

Az illóolajok és a komponens törzsoldatából felező hígítási sort készítettünk, előzetes irodalmi adatok alapján a fahéjolaj és fahéjaldehid esetében 0,015-8 µl/ml (Ranasinghe és mtsai. 2002, Ooi és mtsai. 2006, Trajano és mtsai. 2012), a többi illóolaj esetében pedig 0,25-128 µl/ml koncentráció-tartományban (Ramezani és mtsai. 2002, El-Zemity és Ahmad 2005, Pepeljnjak és mtsai. 2005, Dzamic és mtsai. 2007, Terzi és mtsai. 2007, de Lira Mota és mtsai. 2012, Nikolić és mtsai. 2013).

A szakirodalomban egyértelmű megállapodás hiányában az illóolajok gátló koncentráció-értékeit térfogat- vagy tömegszázalékban, esetleg anyagmennyiség-százalékban tüntetik fel. Ez sok esetben megnehezíti az eredmények pontos összevetését. Annak érdekében, hogy a kapott eredmények összevethetőek legyenek az antifungális szer érzékenységi tesztek eredményeivel, illetve valamennyi releváns, illóolajokkal kapcsolatos szakirodalmi adattal, a µl/ml-ben kapott értékeket µg/ml-ben közöljük. Az értékek átkonvertálása a **3. táblázat**ban szereplő sűrűségértékek alapján történt.

Az illóolajok MIC-értékeinek szemléletesebb interpretációjához a Sartoratto és munkatársai (2004) által leírt határértékeket vettük alapul: egy illóolaj erős antifungális hatásúnak tekinthető, ha a  $MIC \leq 500$  µg/ml, mérsékeltnek abban az esetben, ha  $600 \leq MIC \leq 1500$  µg/ml és gyengének, ha a  $MIC > 1500$  µg/ml.

#### **5.5.4.2. Illóolaj-komponens - antifungális szer kombinációk *in vitro* növekedésgátló hatásának vizsgálata**

A továbbiakban az **5.8. pont**ban leírt *checkerboard* titrálással, hatóanyag-kombinációs tesztekben vizsgáltuk a fahéjaldehid (a fahéjolaj fő komponense, Sigma-Aldrich) és a NTM együttes növekedésgátló hatását *Fusarium*-okkal szemben.

A NTM és fahéjaldehid törzsoldatából RPMI 1640 tápoldattal felező hígítási sort mértünk össze. A tesztekben alkalmazott hatóanyag koncentrációkat a mikrodilúciós tesztek eredményei alapján állapítottuk meg: a NTM végső koncentráció-tartománya 0,5-256 µg/ml, a fahéjaldehid vizsgált koncentráció-tartománya pedig 8,2-525 µg/ml volt.

#### **5.5.4.3. Illóolajok okozta morfológiai változások mikroszkópos vizsgálata**

A mikrodilúciós tesztek során leghatékonyabbnak bizonyuló illóolaj (a fahéjolaj), illetve fő komponensének (fahéjaldehid) hatását a *Fusarium* konídiumok csírázó- és életképességére,

valamint metabolikus aktivitására fény- és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Mindehhez a keratitiszből leggyakrabban izolált fajkomplexum, az FSSC egyik képviselőjét választottuk ki (Chakrabarti és Singh 2011). Az FSSC SZMC 21315 törzs konídiumait  $1 \times 10^5$  konídium/ml végkoncentrációban oltottuk le szubletális 0,015  $\mu\text{l/ml}$  koncentrációjú fahéjolajjal (15  $\mu\text{g/ml}$ ) vagy fahéjaldehiddel (16,4  $\mu\text{g/ml}$ ) kiegészített MM tápoldatba. Az így kapott elegyet steril fedőlemezekre oltottuk, ezzel lehetővé téve a konídiumok kitapadását a lemezek felületére a 25 °C-on történő, 2, 6 és 16 órán át tartó inkubációs idők alatt. A negatív/kezeletlen kontroll mintákhoz alkalmazott MM tápoldat nem tartalmazott sem fahéjolajat, sem fahéjaldehidet.

A fedőlemezekre kitapadt konídiumok vizualizálásához fluoreszcens lámpával felszerelt fénymikroszkópot használtunk (LR 66238C, Carl Zeiss, AxioLab), a képeket pedig az ehhez tartozó mikroszkópkamerával rögzítettük (AxioCam ERc 5s, Carl Zeiss, AxioLab).

Az alábbiakban részletezett kísérletek mindegyikét egymástól függetlenül, háromszor ismételtük meg. A végső, dolgozatban is közölt eredmények a három kísérlet értékeinek átlagából származnak.

**Csírázóképesség vizsgálata.** Az inkubációs idők elteltével mind a kezeletlen, mind a fahéjolaj- és fahéjaldehid-kezelt mintákban megszámloltuk a csírázó és nem csírázó konídiumok arányát a fénymikroszkóp véletlenszerűen kiválasztott 10-10 látómezejében.

**Életképesség és metabolikus aktivitás vizsgálata.** A fahéjolajjal és komponensével kezelt, valamint a kezeletlen konídiumok metabolikus aktivitását és életképességét *FUN1* viabilitási festéssel vizsgáltuk. Kísérleteink során a gyártó által kidolgozott eredeti protokollt adaptáltuk az általunk alkalmazott technikára. A 2, 6 és 16 órás inkubációs idők leteltével a fedőlemezeket HEPES pufferrel mostuk, majd további 30 percen át 25 °C-on 2% (w/v) glükózzal kiegészített HEPES pufferben inkubáltuk a lemezeket, végül egy újabb HEPES pufferrel történő mosás után 5  $\mu\text{M}$  *FUN1* festékkoldattal sötétben 30 percen keresztül festettük a mintáinkat. A festést követően az elpusztult sejtek sárgászöld, az élő sejtek citoplazmája pedig zöld fluoreszcenciát mutat. A vakuoláris struktúrák piros fluoreszcenciája a plazmamembrán integritására és a sejtek metabolikus aktivitására utal.

**Apoptotikus és nekrotikus események vizsgálata.** A kezelt és kezeletlen mintákban lehetségesen előforduló apoptotikus és nekrotikus konídiumok arányát az *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* (Sigma-Aldrich) segítségével határoztuk meg. A festési eljárás során a gyártó utasításait követtük. Valamennyi minta esetében a mikroszkóp 20-20 látómezejében határoztuk meg a korai apoptotikus (*Annexin V-FITC* pozitív - zöld fluoreszcencia), nekrotikus (*Annexin V-FITC* és *PI* pozitív - piros fluoreszcencia) és élő (*Annexin V-FITC* és *PI* negatív - nincs fluoreszcencia) konídiumok arányát. Az *Annexin V-FITC* egy membrán-



impermeábilis festék, ami az apoptózis kimutatására szolgál. Specifikusan köt a foszfatidil-szerinhez, ami az apoptózis kezdeti stádiumában végbemenő membrán átrendeződés során a membrán belső oldaláról a külső felszínre kerül. A PI szintén membrán-impermeábilis, és a nekrosis kimutatására alkalmas. A membránintegritás megszűnését követően a PI bejut a sejtbe és a DNS-hez kötve pirosan fluoreszkál.

### 5.5.5. Extracelluláris enzimaktivitás-tesztek

A *Fusarium* keratitisz kialakulásában feltételezetten szerepet játszó extracelluláris enzimek felderítése érdekében 67 klinikai és környezeti izolátum (**3. melléklet**) proteáz- (elasztáz, kazeináz és keratináz), foszfolipáz- és lipáztermelő képességét vizsgáltuk meg. Emellett teszteltük az izolátumok extraceluláris pektináz és celluláz aktivitását is.

Az **5.2. pont**ban leírt módon elkészített speciális táplemezek közepére a vizsgált izolátumok 7 napos, PDA-n nevelt telepszéleiből egy-egy 7 mm átmérőjű micéliumkorongot oltottunk le. A proteáz-, lipáz- és foszfolipáz-tesztek során 1 hetes, 37 °C-on történő inkubáció után, a celluláz és pektináz aktivitás vizsgálata során pedig 3 napos, 30 °C-on történő inkubációt követően állapítottuk meg az egyes izolátumok enzimaktivitásának mértékét a telep (TÁ) és a körülötte megfigyelt feltisztulási zóna (FÁ) átmérőjének arányából. A két értékből a Blanco és munkatársai (2002) által leírt elasztáz aktivitási index mintájára ún. enzim aktivitási indexet (EAI) számoltunk:  $EAI = FÁ/TÁ$ .

Az extracelluláris **keratináz** aktivitás vizsgálatához az **5.2. pont**ban leírt módon elkészített keratin-azúr tartalmú tápoldatba az egyes izolátumok konídium-szuszpenzióit  $10^5$  konídium/ml végkoncentrációban oltottuk le, majd 37 °C-on, 2 héten át 200 rpm-en rázatva tenyésztettük. A negatív kontrollként használt mintát a beoltott konídium-szuszpenziókkal megegyező térfogatú steril desztillált vízzel egészítettük ki. Ha egy adott izolátum képes volt a keratin(azúr) bontására, az azúrkék festék felszabadulása következtében a tápoldatok elkékültek. A kékülés mértéke jelezte az izolátumok keratinbontó képességét. A tápoldatokból 1 és 2 hét elteltével vettünk mintát, majd miután a micéliumokat és a keratin-azúrt 13 000 rpm-en centrifugálva kiülepítettük, lemértük a felülúszók abszorbanciáját (OD<sub>620</sub>, SPECTROstar Nano, BMG LABTECH). A kapott értékek alapján számszerűsítettük az izolátumok keratináz aktivitásának mértékét és EAI-t számoltunk: a negatív kontrollhoz tartozó fényelnyelés mértékét vettük 1-nek, és ehhez viszonyítottuk az összes többi minta fényelnyelését.

### **5.5.6. Statisztikai analízis**

Az adatok statisztikai analízisét az RStudio 0.97.318 szoftver segítségével végeztük el. A hipotézisvizsgálathoz, illetve a szignifikancia megállapításához kétmintás t-próbát használtunk. Amennyiben egy vizsgált adatsorra a t-teszt használatának feltételei nem teljesültek, Mann-Whitney-próbát alkalmaztunk. Statisztikailag  $p < 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak a különbséget.

## 6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 6.1. *Fusarium* izolátumok azonosítása molekuláris módszerekkel

A klinikai izolátumok azonosítását szekvenencia- és PCR-alapú molekuláris módszerek segítségével végeztük el. Eredményeinket a **7. táblázat** foglalja össze.

#### 6.1.1. Szekvenenciaalapú azonosítás

A 2010-2011-ben izolált *Fusarium* törzseket a *TUB* és *TEF1* gének szekvenciárészletei alapján azonosítottuk az NCBI, a FUSARIUM-ID és a *Fusarium* MLST szekvenencia-adatbázisaiban, a BLAST homológia-kereső program segítségével. A szekvenciákat az *EMBL European Nucleotide Archive* adatbázisában tettük hozzáférhetővé. A szekvenciákhoz tartozó EMBL azonosítókat a **7. táblázat** tartalmazza. A *TEF1* és *TUB* szekvenciák alapján a 70 izolátum közül 53 az FSSC, 6 az FDSC, 5 az FFSC, 4 az FOOSC és további 2 az FIESC képviselőjének bizonyult (**7. táblázat, 3. ábra**). Fajszínten 8 izolátumot azonosítottunk: az FDSC-n belül valamennyi izolátum *F. delphinoides*-nek, az FFSC-n belül 3 izolátum (SZMC 11491, SZMC 11493 és SZMC 11497) *F. napiforme*-nek bizonyult.



**3. ábra: Klinikai *Fusarium* izolátumok telepmorfológiája PDA táptalajon, 7 nap inkubációt követően. FDSC: *F. dimerum* fajkomplexum; FFSC: *F. fujikuroi* fajkomplexum; FIESC: *F. incarnatum-equiseti* fajkomplexum; FOOSC: *F. oxysporum* fajkomplexum; FSSC: *F. solani* fajkomplexum.**

Az FSSC tagjait a humán keratomikózis fő kórokozójaként tartják számon (Naiker és Odhav 2004), de emellett az általunk azonosított fajkomplexumok mindegyikét azonosították korábban *Fusarium* keratitiszből (Iqbal és mtsai. 2008, Hassan és mtsai. 2016). Hassan és munkatársai (2016) az általunk vizsgált időszakot követően, 2012-2013-ban morfológiai alapon összesen 196 *Fusarium*-ot azonosítottak a coimbatore-i *Aravind Eye Hospital & Postgraduate Institute of Ophthalmology* mikrobiológiai laboratóriumában. Ezek közül 65 izolátumot a *TEF1* és *RPB2* gének szekvenciárészletei alapján is meghatároztak: eredményeinkhez hasonlóan az izolátumok többsége (n=54) az FSSC (*F. falciforme*, *F.*

*keratoplasticum*, *F. lichenicola*), további 7 az FDSC (*F. delphinooides*, *F. dimerum*), 3 az FFSC (*F. nygamai*, *F. sacchari*) és 1 az FOOSC (*F. oxysporum*) képviselőjének adódott.

### 7. táblázat: A klinikai izolátumok molekuláris azonosításának eredményei.

KLINIKAI IZOLÁTUMOK					
SZMC azonosító <sup>a</sup>	TEF1 és TUB szekvenciák alapján azonosított fajkomplexum (faj) <sup>b</sup>	EMBL azonosító <sup>c</sup>		A TEF1 FSSC-specifikus emésztése EcoRI-el <sup>d</sup>	FSSC-specifikus PCR <sup>e</sup>
		TUB	TEF1		
SZMC 11492	FDSC ( <i>F. delphinooides</i> )	HF569971	HF569904	-	+
SZMC 11496	FDSC ( <i>F. delphinooides</i> )	HF569974	HF569907	-	-
SZMC 11499	FDSC ( <i>F. delphinooides</i> )	HF569977	HF569910	-	-
SZMC 11501	FDSC ( <i>F. delphinooides</i> )	HF569980	HF569913	-	-
SZMC 11503	FDSC ( <i>F. delphinooides</i> )	HF569985	HF569918	-	-
SZMC 11509	FDSC ( <i>F. delphinooides</i> )	HF569994	HF569927	-	-
SZMC 11486	FFSC	HF569957	HF569890	-	-
SZMC 11487	FFSC	HF569962	HF569895	-	-
SZMC 11488	FFSC	HF569963	HF569896	-	-
SZMC 11491	FFSC ( <i>F. napiforme</i> )	HE984154	HE984153	-	-
SZMC 11493	FFSC ( <i>F. napiforme</i> )	HE984151	HE984150	-	-
SZMC 11497	FFSC ( <i>F. napiforme</i> )	HF570006	HE984152	-	-
SZMC 11481	FIESC	HF569948	HF569881	-	-
SZMC 11489	FIESC	HF569964	HF569897	-	+
SZMC 11483	FOOSC	HF569950	HF569883	-	-
SZMC 11504	FOOSC	HF569986	HF569919	-	-
SZMC 11505	FOOSC	HF569987	HF569920	-	+
SZMC 11474	FSSC	HF569939	HF569872	+	+
SZMC 11475	FSSC	HF569940	HF569873	+	+
SZMC 11477	FSSC	HF569943	HF569876	+	+
SZMC 11478	FSSC	HF569944	HF569877	+	+
SZMC 11479	FSSC	HF569945	HF569878	+	+
SZMC 11480	FSSC	HF569946	HF569879	+	+
SZMC 11484	FSSC	HF569951	HF569884	+	+
SZMC 11485	FSSC	HF569954	HF569887	+	+
SZMC 11490	FSSC	HF569968	HF569901	+	+
SZMC 11494	FSSC	HF569972	HF569905	+	+
SZMC 11495	FSSC	HF569973	HF569906	+	+
SZMC 11498	FSSC	HF569976	HF569909	+	+
SZMC 11500	FSSC	HF569978	HF569911	+	+
SZMC 11502	FSSC	HF569981	HF569914	+	-
SZMC 11506	FSSC	HF569989	HF569922	+	+
SZMC 11508	FSSC	HF569993	HF569926	+	+
SZMC 11511	FSSC	HF569997	HF569930	+	+
SZMC 11512	FSSC	HF569998	HF569931	+	+
SZMC 11513	FSSC	HF570000	HF569933	+	+
SZMC 11514	FSSC	HF570003	HF569936	+	+

7. táblázat Klinikai izolátumok (folytatás)

SZMC azonosító <sup>a</sup>	TEF1 és TUB szekvenciák alapján azonosított fajkomplexum (faj) <sup>b</sup>	EMBL azonosító <sup>c</sup>		A TEF1 FSSC-specifikus emésztése EcoRI-el <sup>d</sup>	FSSC- specifikus PCR <sup>e</sup>
		TUB	TEF1		
SZMC 11515	FSSC	HF570005	HF569938	+	+
SZMC 11516	FSSC	HF569947	HF569880	+	+
SZMC 11517	FSSC	HF569952	HF569885	+	+
SZMC 11518	FSSC	HF569955	HF569888	+	+
SZMC 11519	FSSC	HF569965	HF569898	+	+
SZMC 11520	FSSC	HF569966	HF569899	+	+
SZMC 11521	FSSC	HF569970	HF569903	+	+
SZMC 11522	FSSC	HF569975	HF569908	+	+
SZMC 11523	FSSC	HF569982	HF569915	+	+
SZMC 11524	FSSC	HF569991	HF569924	+	+
SZMC 11525	FSSC	HF570004	HF569937	+	+
SZMC 11527	FSSC	HF569941	HF569874	+	+
SZMC 11528	FSSC	HF569942	HF569875	+	+
SZMC 11529	FSSC	HF569949	HF569882	+	+
SZMC 11530	FSSC	HF569953	HF569886	+	+
SZMC 11531	FSSC	HF569956	HF569889	+	+
SZMC 11532	FSSC	HF569958	HF569891	+	+
SZMC 11533	FSSC	HF569959	HF569892	+	+
SZMC 11534	FSSC	HF569960	HF569893	+	+
SZMC 11535	FSSC	HF569961	HF569894	+	+
SZMC 11536	FSSC	HF569967	HF569900	+	+
SZMC 11537	FSSC	HF569969	HF569902	+	+
SZMC 11538	FSSC	HF569979	HF569912	+	+
SZMC 11539	FSSC	HF569983	HF569916	+	+
SZMC 11540	FSSC	HF569984	HF569917	+	+
SZMC 11541	FSSC	HF569988	HF569921	+	-
SZMC 11542	FSSC	HF569990	HF569923	+	+
SZMC 11543	FSSC	HF569992	HF569925	+	+
SZMC 11544	FSSC	HF569999	HF569932	+	+
SZMC 11545	FSSC	HF570001	HF569934	+	+
SZMC 11546	FSSC	HF570002	HF569935	+	+
SZMC 11547	FSSC	HF569995	HF569928	+	+
SZMC 11548	FSSC	HF569996	HF569929	+	+

<sup>a</sup>SZMC: Szeged Microbiological Collection, Szeged, Magyarország.

<sup>b</sup>FDSC: *F. dimerum* fajkomplexum; FFSC: *F. fujikuroi* fajkomplexum; FIESC: *F. incarnatum-equiseti* fajkomplexum; FOOSC: *F. oxysporum* fajkomplexum; FSSC: *F. solani* fajkomplexum.

<sup>c</sup>EMBL: European Molecular Biology Laboratory Nucleotide Sequence Database

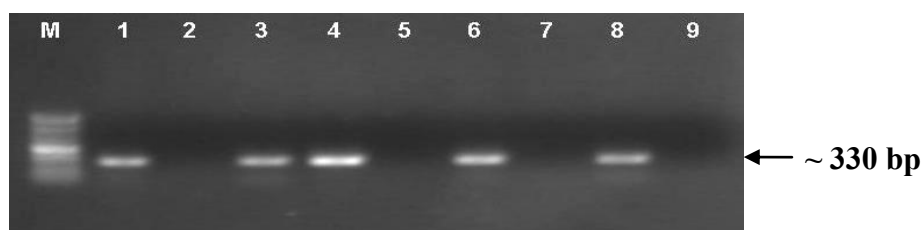
<sup>d</sup>"+": A 770-790 bp-os parciális *TEF1* (transzlációs elongációs faktor 1 $\alpha$ ) amplikon *EcoRI*-el való emésztése egy 470-490 és egy 270-300 bp-os fragmentumot eredményezett; "-": A parciális *TEF1* amplikont az *EcoRI* restrikciós endonukleáz nem emésztette.

<sup>e</sup>A He és munkatársai (2011) által leírt PCR-alapú azonosítási módszer eredményei: "+": Az FSSC-specifikus PCR egy ~330 bp amplikont eredményezett; "-": Az FSSC-specifikus PCR során termék nem képződött.

A *F. napiforme*-t először Marasas és munkatársai (1987) írták le. Elsőként kölesről és cirokról izolálták, majd később Argentínában csirketakarmányból (Magnoli és mtsai. 1999), Afrikában és Ausztráliában talajból is azonosították (Jeschke és mtsai. 1990, Sangalang és mtsai. 1995). Humán megbetegedésekért ritkán felelős, napjainkig mindössze 3 esetben írták le disszeminált- és tüdőfertőzésekből (Melcher és mtsai. 1993, Lee és mtsai. 2000, Unoura és mtsai. 2011). Vizsgálataink során elsőként azonosítottuk a *F. napiforme*-t humán keratomikózisból. A *TEF1* szekvenciák BLAST analízise alapján az izolátumok 98,5-99,3%-os egyezést mutattak a *F. napiforme* NRRL 13604 törzssel (Szekvencia-azonosító: AF160266).

#### 6.1.2. *Fusarium solani* fajkomplexumhoz tartozó törzsek specifikus, PCR-alapú azonosítása

A He és munkatársai (2011) által leírt FSSC-specifikus primerek segítségével végrehajtott PCR eredményeit a **7. táblázat** foglalja össze. A **4. ábra** a klinikai izolátumok egy mintapopulációjára összemért reakciók eredményeit mutatja be. A keratitiszből származó klinikai izolátumok közül összesen 54 esetében detektáltuk a csak FSSC izolátumoknál várt ~330 bp hosszúságú amplikont. Az 54 izolátumból a korábbi azonosítási eredmények alapján 51 az FFSC, 1-1 pedig az FDSC, FIESC és FOOSC részét képezi. A negatív kontrollként alkalmazott további 10 *Fusarium* izolátum (*F. asiaticum*, *F. avenaceum*, *F. boothii*, *F. cerealis*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. polyphialidicum*, *F. pseudograminearum*; **8. táblázat**) egyikénél sem keletkezett FSSC-specifikus PCR-termék. Összesen 3 fals pozitív (FDSC SZMC 11492, FIESC SZMC 11489, FOOSC SZMC 11505), 2 fals negatív (FSSC SZMC 11502 és SZMC 11541) és 75 helyes, a vártnak megfelelő pozitív vagy negatív eredményt kaptunk (**7 és 8. táblázat**).



**4. ábra:** A *Fusarium solani* fajkomplexum-specifikus PCR eredménye. **M:** pUC mix marker. **1, 5 és 9:** FDSC (*F. dimerum* fajkomplexum, *F. delphinoides* SZMC 11492, SZMC 11496, SZMC 11499). **2 és 7:** FFSC (*F. fujikuroi* fajkomplexum, *F. napiforme* SZMC 11493, SZMC 11497). **3, 4, 6 és 8:** FSSC (*F. solani* fajkomplexum, SZMC 11494, SZMC 11495, SZMC 11522, SZMC 11498).

**8. táblázat: A *Fusarium solani* fajkomplexum-specifikus azonosítási módszerek ellenőrzése során alkalmazott *Fusarium* izolátumok.**

Azonosító <sup>a</sup>	Fajkomplexum/Faj <sup>b</sup>	A <i>TEF1</i> FSSC-specifikus emésztése <i>EcoRI</i> -el <sup>c</sup>	FSSC-specifikus PCR <sup>d</sup>
SZMC 11049	FSAMSC ( <i>F. boothii</i> )	-	-
SZMC 11051	FSAMSC ( <i>F. boothii</i> )	-	-
SZMC 11056	FSAMSC ( <i>F. graminearum</i> )	-	-
SZMC 11044	FTSC ( <i>F. avenaceum</i> )	-	-
SZMC 11055	FSAMSC ( <i>F. asiaticum</i> )	-	-
SZMC 11038	FSAMSC ( <i>F. pseudograminearum</i> )	-	-
SZMC 11048	FSAMSC ( <i>F. cerealis</i> )	-	-
NRRL 12375	FSAMSC ( <i>F. culmorum</i> )	-	-
NRRL 29388	FSAMSC ( <i>F. culmorum</i> )	-	-
SZMC 11042	FCOSC ( <i>F. polyphialidicum</i> )	-	-

<sup>a</sup>**SZMC:** Szeged Microbiological Collection, Szeged, Magyarország; **NRRL:** Northern Regional Research Laboratory, Agricultural Research Service Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, USA.

<sup>b</sup>**FCOSC:** *F. concolor* fajkomplexum; **FSAMSC:** *F. sambucinum* fajkomplexum; **FTSC:** *F. tricinctum* fajkomplexum.

<sup>c</sup>"+" : A 770-790 bp-os parciális *transzlációs elongációs faktor TEF1* ampikon *EcoRI*-el való emésztése egy 470-490 és egy 270-300 bp-os fragmentumot eredményezett; "-" : A parciális *TEF1* ampikont az *EcoRI* restrikciós endonukleáz nem emésztette.

<sup>d</sup>A He és munkatársai (2011) által leírt PCR-alapú azonosítási módszer eredményei: "+" : Az FSSC-specifikus PCR egy ~330 bp ampikont eredményezett; "-" : Az FSSC-specifikus PCR során termék nem képződött.

**6.1.3. Új módszer a *Fusarium solani* fajkomplexum képviselőinek azonosítására: a *TEF1* szekvencia hasítása *EcoRI* restrikciós endonukleázzal**

Az FSSC a *Fusarium* keratitisz leggyakoribb kórokozója Dél-Indiában (Lalitha és mtsai. 2008b). Tagjai gyakran rezisztenciát mutatnak a konvencionális antimikotikumokkal szemben (Azor és mtsai. 2007). Ezért céljaink között szerepelt egy egyszerű, gyors és specifikus módszer kidolgozása, amely meggyorsíthatja az azonosítás folyamatát és lerövidítheti az FSSC-specifikus terápia megkezdéséig eltelt időt.

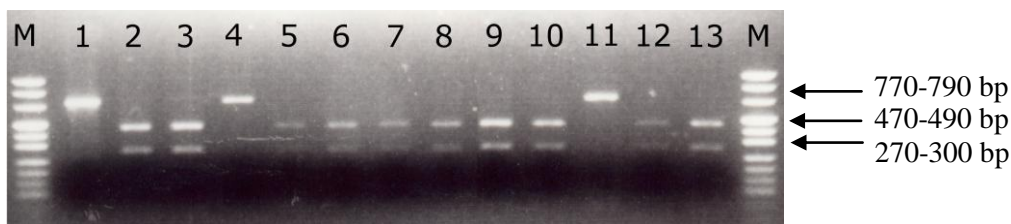
Ennek érdekében a 70, humán keratitiszből származó *Fusarium* izolátum és egyéb, humán fertőzésekkel kapcsolatba hozható *Fusarium* törzsek génbanki *TEF1* és *TUB* szekvenciáinak *in silico* analízise során olyan restrikciós endonukleáz hasítóhelyeket kerestünk, amelyek alkalmasak lehetnek fajok vagy fajkomplexumok specifikus elkülönítésére, illetve azonosítására. Mindehhez a BioEdit v. 7.1.3.0 (Hall 1999) program "Sequence/Nucleic Acid/Restriction Map" menüponton keresztül elérhető restrikciós

térképészítő funkcióját használtuk. A *TUB* szekvenciákban nem találtunk sem faj-, sem fajkomplexum-specifikus hasítóhelyeket. Viszont az *in silico* vizsgálatok alapján az FSSC-hez tartozó *TEF1* szekvenciák mind tartalmazták az *EcoRI* restrikciós endonukleáz hasítóhelyeit (5'-G<sup>↓</sup>AATTC-3') (5. ábra).

<b>FCSC PCB</b>	T C G A T C G C G C G C C - C T T A T A C C C A T C G A T C C A T G A T T C
<b>FCSC DEB15</b>	T C G A T C G C G C G C C - C T T A T A C C C A T C G A T C C A T C A T T C
<b>FDSC SZMC 11501</b>	T C G A T T C C T G A G C A T T T T A C C A C G - C G A T - - - - -
<b>FDSC CBS 116521</b>	T C C A T T C C T G A G C C T T T C C C T A C G - C G A T - - - - -
<b>FFSC SZMC 11493</b>	T C G A T C G C G C G T C - C T T A G T A C A C C G A T T C C T C C C T -
<b>FFSC CSV1</b>	T C G A T C G C G C G T C - C T T T - G C C C A C C G A T T T C - C C T T -
<b>FIESC SZMC 114811</b>	C C G A T C G C A C G C C - C T C - T A C C C A C C G A T C C A T C A G T C
<b>FIESC M02-7033S-4</b>	C C G A T C G C A C G C C - C T C - T A C C C A C C G A T C C A T C A G T C
<b>FOSC SZMC 11504</b>	T C G A T C G C G C G T C - C T T T - G T A C A C G A T T T C - C C C T -
<b>FOSC SAT75</b>	T C G A T C G C G C G T C - C T T T - G T A C A T C G A T T T C - C C C T -
<b>FSAMSC NRRL 3299</b>	T C G A T C G C G C G C C - C T T C T T C C C A T C G A C C C A T C A T T C
<b>FSAMSC NRRL 26342</b>	T C G A T C G C G C G C C - C T T C T T C C C A T C G A C C C A T C A T T C
<b>FSSC SZMC 11474</b>	C C G A T C G C A C C T T G C T A T T C C A C A A C <u>G A A T T C</u> C C T C C C
<b>FSSC FMR 7988</b>	C C G A T C G C G C C T T G C T A T T C C A C A A C <u>G A A T T C</u> C C T C C C

**5. ábra: Klinikai jelentőségű *Fusarium* fajkomplexumokhoz tartozó törzsek *TEF1* szekvenciáinak illesztése.** Az *EcoRI* restrikciós endonukleáz specifikus hasítóhelyének szekvenciáját (G<sup>↓</sup>AATTC, kerettel jelölve) csak az *F. solani* fajkomplexum (FSSC) képviselőinek *TEF1* szakasza hordozza. **FCSC:** *F. chlamyosporum* fajkomplexum; **FDSC:** *F. dimerum* fajkomplexum; **FFSC:** *F. fujikuroi* fajkomplexum; **FIESC:** *F. incarnatum-equiseti* fajkomplexum; **FOSC:** *F. oxysporum* fajkomplexum; **FSAMSC:** *F. sambucinum* fajkomplexum.

Annak érdekében, hogy az *in silico* eredményeinket laboratóriumi kísérletekkel is alátámasszuk, az FSSC-specifikus PCR-alapú módszernél már leírt 80 klinikai és környezeti *Fusarium* izolátum *TEF1* szakaszának *EcoRI*-el történő emésztését végeztük el. Az emésztés eredményeit a **7. és 8. táblázat** foglalja össze. Valamennyi FSSC izolátum esetében a *TEF1* PCR-termékek emésztése két fragmentumot eredményezett, egy 470-490 bp és egy 270-300 bp hosszúságút, a nem FSSC izolátumok esetében viszont az emésztetlen, 770-790 bp hosszúságú *TEF1* amplikont figyeltük meg (**6. ábra**). Fals negatív vagy fals pozitív eredményeket nem figyeltünk meg.



**6. ábra: *TEF1* amplikonok *EcoRI* enzimmel történő emésztésének eredménye.** M: pUC mix marker; **1:** *F. incarnatum-equiseti* fajkomplexum; **2-3, 5-10 és 12-13:** *F. solani* fajkomplexum; **4:** *F. oxysporum* fajkomplexum; **11:** *F. dimerum* fajkomplexum (*F. delphinoides*).



Az általunk kidolgozott, *EcoRI*-emésztésen alapuló módszer a **6.1.2. pontban** leírt FSSC-specifikus PCR-hez képest pontosabbnak bizonyult: az emésztésen alapuló módszer az esetek 100%-ában, a PCR-alapú módszer pedig az esetek 93,75%-ában adott helyes eredményt.

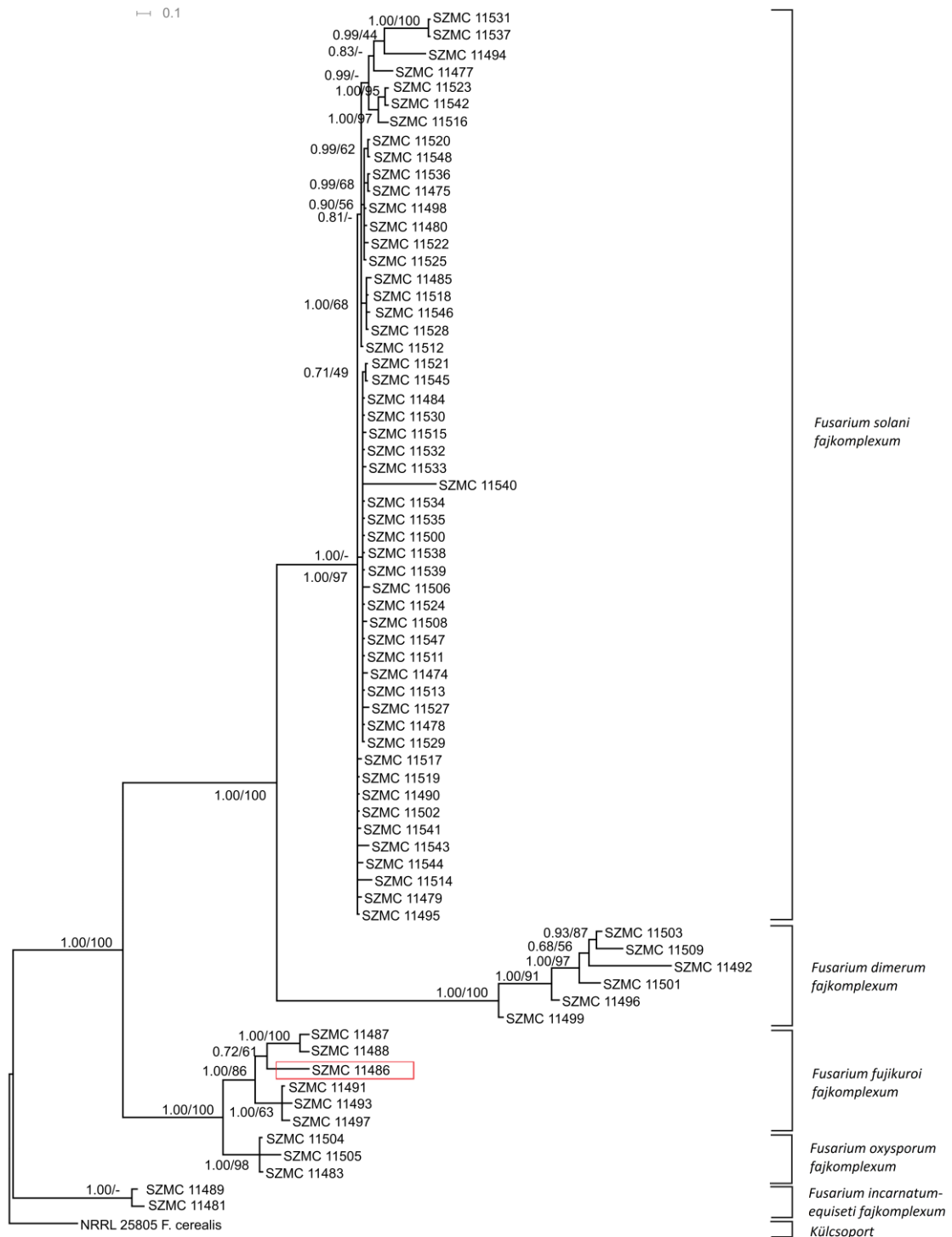
#### **6.1.4. *Fusarium solani* fajkomplexumhoz tartozó törzsek izolálása indiai klinikai és környezeti mintákból**

Számos 2010-2011 folyamán izolált klinikai törzs többszöri átoltás után sem volt tenyésztethető. Emellett a klinikai és környezeti FSSC izolátumok extracelluláris enzimaktivitásának összehasonlításához nem álltak rendelkezésünkre a klinikai izolátumokkal megegyező régióból származó talaj- és növényi izolátumok. Ezért a további kísérletek (illóolajok antifungális hatásának vizsgálata, extracelluláris enzimaktivitás-tesztek) megkezdéséhez 2012 őszén mind klinikai, mind környezeti (talaj- és növényi) FSSC izolátumok gyűjtését hajtottuk végre. Az izolátumok azonosítását először morfológiai alapon, majd a korábbi tesztek során megbízható eredményeket szolgáltató *TEF1* amplikonok *EcoRI*-emésztésével és a He és munkatársai (2011) által leírt FSSC-specifikus PCR segítségével hajtottuk végre. A mindkét módszer alapján FSSC-nek bizonyuló törzseket az SZMC (Szeged, Magyarország) törzsgyűjteményben helyeztük el. Az izolátumok listáját és a hozzájuk tartozó törzsgyűjteményi azonosítókat az 1. sz. melléklet tartalmazza. Összesen 23 klinikai, 19 talajból és 2 növényekről származó FSSC törzset izoláltunk.

#### **6.2. Klinikai *Fusarium* izolátumok filogenetikai analízise**

A 2010-2011 folyamán humán szaruhártya-gyulladásból izolált 70 *Fusarium* törzs leszármazási kapcsolatainak rekonstrukcióját a *TEF1* és *TUB* szekvenciák alapján Bayes-féle és *Maximum Likelihood* analízissel hajtottuk végre.

A becsült törzsfán az izolátumok fajkomplexumonként 5, magas támogatottsági értékkel rendelkező kládba csoportosultak: az első klád tartalmazta az FSSC izolátumokat (Bayes-féle poszterior valószínűség, BPP: 1,00; *Maximum Likelihood bootstrap* érték, MLBS: 97%), a második az FDSC (BPP: 1,00; MLBS: 100%), a harmadik az FFSC (BPP: 1,00; MLBS: 86%), a negyedik az FOSSC (BPP: 1,00; MLBS: 98%), az ötödik pedig az FIESC izolátumokat (BPP: 1,00, MLBS: -) (**7. ábra**).



**7. ábra: A *TEF1* és *TUB* szekvenciárészek alapján becsült kombinált filogram.** Az egyes nóduszokban a Bayes-féle analízis során kapott poszterior valószínűség értékeket és a *Maximum Likelihood* analízis során kapott *bootstrap*-értékeket is feltüntettük. Piros kerettel jelölve: a *TEF1* és *TUB* szekvenciák alapján FOSC-hez sorolt SZMC 11486 izolátum a filogenetikai analízis alapján az FFSC klád részét képezi.

A filogenetikai analízis egy kivétellel megerősítette a korábban elvégzett szekvenciaalapú molekuláris azonosítási eredményeket. Az SZMC 11486 azonosító számú, *TEF1* és *TUB* szekvenciák alapján FOOSC-hez sorolt izolátum a filogenetikai analízis alapján az FFSC klád része. Így a 70 izolátumból 53 az FSSC, 6-6 az FDSC és FFSC, 3 az FOOSC és 2 az FIESC fajkomplexum képviselőjének bizonyult.

### 6.3. Klinikai *Fusarium* izolátumok antifungális szerek iránti érzékenysége vizsgálat

#### 6.3.1. Antifungális szerek iránti érzékenység vizsgálata mikrodilúcióval

A 2010-2011-ből származó klinikai *Fusarium* izolátumok *in vitro* érzékenységét összesen 7 antifungális szer, 2 polién (AMB és NTM), 4 azol (CLT, ECN, ITC és VRC) és 1 allilamin (TRB) iránt határoztuk meg. Eredményeinket a **9. táblázat** foglalja össze.

#### 9. táblázat: Konvencionális antifungális szerek MIC-értékeinek eloszlása fajkomplexumonkénti bontásban.

Faj-komplexum <sup>a</sup>	Antifungális szer <sup>b</sup> / MIC (µg/ml)						
	AMB	VRC	CLT	ITC	ECN	NTM	TRB
<b>FDSC (n=6)</b>	4-64	16-64	64->64	>64	64->64	2-8	2-32
<b>FFSC (n=6)</b>	16->64	64->64	>64	>64	64	8->64	1-32
<b>FIESC (n=2)</b>	32->64	32->64	>64	>64	64	4->64	8-64
<b>FOOSC (n=3)</b>	4->64	64->64	>64	>64	32->64	8->64	32-64
<b>FSSC (n=53)</b>	0,5->64	0,125->64	4->64	8->64	8->64	2->64	1->64
<b>MIC-tartomány</b>	<b>0,5-&gt;64</b>	<b>0,125-&gt;64</b>	<b>4-&gt;64</b>	<b>8-&gt;64</b>	<b>8-&gt;64</b>	<b>2-&gt;64</b>	<b>1-&gt;64</b>
<b>MIC<sub>50</sub><sup>c</sup></b>	<b>16</b>	<b>64</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;64</b>	<b>8</b>	<b>32</b>
<b>MIC<sub>90</sub><sup>c</sup></b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;64</b>	<b>128</b>	<b>64</b>

<sup>b</sup>FDSC: *F. dimerum* fajkomplexum; FFSC: *F. fujikuroi* fajkomplexum; FIESC: *F. incarnatum-equiseti* fajkomplexum; FOOSC: *F. oxysporum* fajkomplexum; FSSC: *F. solani* fajkomplexum.

<sup>a</sup>AMB: amfotericin B; CLT: klotrimazol; ECN: ekonazol; ITC: itrakonazol; NTM: natamicin; TRB: terbinafin; VRC: vorikonazol.

<sup>c</sup>MIC<sub>50/90</sub>: az a MIC érték, ami a vizsgált izolátumok 50/90%-ánál okoz teljes növekedésgátlást.

A vizsgált izolátumok túlnyomó többségének növekedését a NTM, AMB és TRB gátolta a leghatékonyabban, ezeket követte a VRC. A NTM az izolátumok mintegy 70%-át ≤16 µg/ml-es koncentrációban gátolta. Ez Lalitha és munkatársai (2008a) szerint megfelel a NTM szemben elérhető, hatékony terápiás koncentrációjának. Az ECN és CLT az FSSC izolátumok kb. 20-30%-ának növekedését 4-64 µg/ml-es koncentrációban gátolta, ám az izolátumok többségénél nem okozott teljes növekedésgátlást (MIC>64 µg/ml). Az ITC egy FSSC izolátum kivételével szintén nem okozott teljes gátlást a vizsgált koncentráció-

tartományon belül ( $MIC > 64 \mu\text{g/ml}$ ). A különböző fajkomplexumok antifungális szerek iránti érzékenységében nem tapasztaltunk jelentősebb eltérést.

A mikrodilúciós tesztek során kapott eredményeink összeegyeztethetőek a szakirodalmi adatokkal. Az FSSC izolátumokkal szemben több tanulmány is az AMB-t, NTM-t és TRB-t találta a leghatékonyabbnak (Azor és mtsai. 2007, Alastruey-Izquierdo és mtsai. 2008, Iqbal és mtsai. 2008, Tan és Cha 2008). Guevara-Suarez és munkatársai (2016) 89 *Fusarium*, ezen belül 49 FSSC izolátum antifungális érzékenységét 5 szerre (AMB, flukonazol, ITC, VRC, pozakonazol) megvizsgálva, az AMB esetében tapasztalták a legalacsonyabb MIC-értékeket ( $1 \rightarrow 16 \mu\text{g/ml}$ ). FSSC izolátumokkal szemben Hassan és munkatársai (2016) szintén az AMB, valamint a VRC esetében regisztrálták a legalacsonyabb MIC-értékeket ( $0,5\text{-}8 \mu\text{g/ml}$ ).

Az FFSC képviselőivel szemben a TRB bizonyult a leghatékonyabbnak ( $MIC: 1\text{-}32 \mu\text{g/ml}$ ). Hassan és munkatársai (2016) a TRB antifungális hatását nem vizsgálták, kísérleteik során a VRC-vel és AMB-vel szemben tapasztalták a legalacsonyabb MIC-értékeket ( $0,5\text{-}4 \mu\text{g/ml}$  és  $1\text{-}4 \mu\text{g/ml}$ ). Al-Hatmi és munkatársai (2015a) kísérleteiben *F. napiforme* és *F. verticillioides* izolátumokkal szemben az AMB  $1\text{-}4 \mu\text{g/ml}$ , a VRC pedig  $1\text{-}8 \mu\text{g/ml}$  koncentráció-tartományban okozott teljes növekedésgátlást, a NTM mérsékelt aktivitást mutatott ( $MIC: 4 \mu\text{g/ml}$ ), az ITC pedig hatástalannak bizonyult az FFSC izolátumokkal szemben a vizsgált koncentráció-tartományon belül. Egy korábbi tanulmányban egy disszeminált fertőzésből izolált *F. napiforme* törzs rezisztensnek bizonyult az AMB-vel és az 5-fluorocitozinnal szemben (Melcher és mtsai. 1993). Habár eredményeinkhez hasonlóan Azor és munkatársai (2009) szintén a TRB-t írták le, mint a *F. napiforme* növekedését leghatékonyabban gátló antifungális szert, az általuk megállapított MIC-értékek ( $0,06\text{-}0,25 \mu\text{g/ml}$ ) több mint egy nagyságrenddel alacsonyabbak voltak az általunk leírt értékekhez képest.

A *F. delphinooides* (FDSC) izolátumok ellen a NTM bizonyult a leghatékonyabbnak ( $MIC$ -tartomány:  $2\text{-}8 \mu\text{g/ml}$ ), ezt követte a TRB, AMB és VRC. A CLT, ECN és ITC a vizsgált koncentráció-tartományon belül nem gátolta az FDSC izolátumok növekedését ( $MIC \geq 64 \mu\text{g/ml}$ ). Hassan és munkatársai (2016) tanulmányában a NTM hasonló hatékonysággal ( $MIC: 8\text{-}16 \mu\text{g/ml}$ ) gátolta az FDSC izolátumok növekedését, de a legaktívabb szer esetükben az AMB volt,  $1\text{-}2 \mu\text{g/ml}$ -es MIC-értékkal. Wang és munkatársai (2011) szintén keratitiszből származó *F. delphinooides* törzsek antifungális szerekkel szembeni *in vitro* érzékenységét vizsgálták: az AMB MIC-értéke  $0,5 \mu\text{g/ml}$ , a VRC MIC-értéke pedig  $8 \mu\text{g/ml}$  volt. Ezzel szemben az általunk tapasztalt AMB és VRC MIC-értékek magasabbak voltak ( $4\text{-}64 \mu\text{g/ml}$  és  $16\text{-}64 \mu\text{g/ml}$ ).

Az FOSC és FIESC izolátumok antifungális szerekkel szembeni érzékenysége alacsonynak bizonyult a vizsgált hatóanyagokkal szemben, egyedül a TRB MIC-értékeit tudtuk minden esetben meghatározni (MIC-tartomány: 32-64 µg/ml). Hassan és munkatársai (2016) mindössze egy *F. oxysporum* törzset izoláltak 2012 és 2013 folyamán az *Aravind Eye Hospital & Postgraduate Institute of Ophthalmology* mikrobiológiai laboratóriumában. Ez az izolátum az AMB iránt bizonyult a legérzékenyebbnek, a legmagasabb MIC-értéket pedig a NTM, nisztatin és flukonazol esetében figyelték meg. Guevara-Suarez és munkatársainak (2016) kísérletei során szintén az AMB bizonyult a legaktívabbnak az FOSC izolátumokkal szemben, az ITC, pozakonazol és flukonazol viszont nem gátolta az izolátumok növekedését a vizsgált koncentráció-tartományon belül. Egy másik tanulmányban humán szaruhártyáról izolált FIESC izolátumokkal szemben az AMB 8 µg/ml, a VRC pedig 4 µg/ml koncentrációban okozott teljes növekedésgátlást (Wang és mtsai. 2011). Azor és munkatársai (2009) kísérletei során FIESC izolátumokkal szemben szintén az AMB bizonyult a leghatékonyabbnak (MIC: 0,5-2 µg/ml).

Shobana és munkatársai (2015) az *Fusarium*-okkal szembeni *in vitro* növekedésgátló hatását vizsgálták. Kísérleteik során a CLT bizonyult a leghatékonyabbnak (MIC: 1-4 µg/ml), ezt követte a VRC (MIC: 1-8 µg/ml) és az ECN (MIC: 2-8 µg/ml). Az ITC bizonyult a legkevésbé aktívnek a vizsgált *Fusarium* törzsekkel szemben (MIC: 16-32 µg/ml). Az általunk leírt magas MIC-értékekhez viszonyítva minden esetben alacsonyabb koncentráció-tartományban tapasztaltak teljes gátlást.

### **6.3.2. Hatóanyag-kombinációk iránti érzékenység vizsgálata**

Munkánk során összesen 42 klinikai izolátum érzékenységét határoztuk meg két, az *in vitro* mikrodilúciós tesztek során hatékonynak bizonyuló, de eltérő hatásmechanizmusú antifungális szer, a NTM és a TRB különböző koncentrációban összemért kombinációival szemben. A két szer között fellépő kölcsönhatásokat a FICI segítségével jellemeztük. A **10. táblázat** fajkomplexumonkénti bontásban mutatja be az átlagos FICI-értékeket és az általuk meghatározott kölcsönhatási típusokat. A két szer együttes alkalmazásával elért antifungális hatás hasonló mértékű vagy erősebb volt a NTM vagy a TRB önállóan elért gátló hatásához képest. 31 esetben (71,8%) tapasztaltunk szinergizmust, 11 esetben (28,2%) pedig indifferens kölcsönhatást a két szer között. Az FIESC és FOSC izolátumok esetében kizárólag szinergista kölcsönhatásokat állapítottunk meg. Antagonizmust egy esetben sem figyeltünk meg a NTM és TRB között. Ezzel ellentétben egy korábbi, szintén szemfertőzésekből származó *Fusarium*-okon végzett tanulmány főleg antagonista kölcsönhatásról (55,3%)

számolt be a NTM és TRB között, emellett 39,4%-ban tapasztaltak indifferens és 5,3%-ban szinergista kölcsönhatást a szerek között (Li és mtsai. 2008). A Li és munkatársai (2008) által vizsgált *Fusarium* izolátumokat faj- vagy fajkomplexum-szinten sem azonosították. Mivel ismert, hogy az egyes fajkomplexumok antifungális szerekkel szembeni érzékenysége eltérő lehet (Wang és mtsai. 2011), ezért az eredmények között tapasztalt különbségek egyik lehetséges magyarázata, hogy a vizsgálatok alapját képező izolátumok eltérő fajokhoz vagy fajkomplexumokhoz tartoztak.

**10. táblázat: A natamicin és terbinafin kombinált alkalmazásának hatása a *Fusarium* izolátumok *in vitro* növekedésére a frakcionális gátló koncentráció index (FICI) alapján.**

Fajkomplexum <sup>a</sup> (n)	SZ <sup>b</sup> (FICI <sub>átlag</sub> ±szórás)	NK <sup>c</sup> (FICI <sub>átlag</sub> ±szórás)
FDSC (n=6)	4 (0,21 ± 0,11)	2 (0,53 ± 0,00)
FFSC (n=6)	5 (0,13 ± 0,09)	1 (0,5)
FIESC (n=2)	2 (0,08 ± 0,09)	0
FOSC (n=3)	3 (0,03 ± 0,03)	0
FSSC (n=25)	17 (0,12 ± 0,09)	8 (0,83 ± 0,35)
n=42	31 (0,11 ± 0,07)	11 (0,62 ± 0,18)

<sup>a</sup>FDSC: *F. dimerum* fajkomplexum; FFSC: *F. fujikuroi* fajkomplexum; FIESC: *F. incarnatum-equiseti* fajkomplexum; FO SC: *F. oxysporum* fajkomplexum; FSSC: *F. solani* fajkomplexum.

<sup>b</sup>SZ: szinergista kölcsönhatás (FICI≤0,5).

<sup>c</sup>NK: nincs kölcsönhatás (0,5<FICI≤4).

Al-Hatmi és munkatársai (2016b) szaruhártyafekélyből izolált FSSC és FFSC törzsek *in vitro* érzékenységét különböző antifungális szerek és a NTM kombinációival szemben vizsgálták (NTM-VRC, NTM-ITC, NTM-mikafungin). Kísérleteik során a NTM-VRC kombinációk 70%-ában, a NTM-ITC kombinációk 15%-ában és a NTM-mikafungin kombinációk 5%-ában tapasztaltak szinergista kölcsönhatást a szerek között. Ahogy vizsgálataink során mi sem tapasztaltunk antagonizmust a NTM és TRB között, úgy Al-Hatmi és munkatársai (2016b) sem számoltak be a vizsgált szerek között fellépő negatív kölcsönhatásról. A szerzők a NTM-VRC kombinációt emelték ki, mint egy, a *Fusarium* keratitisz kezelésére alkalmas kombinációt. Ez és az általunk leírt NTM-TRB kombináció megközelítőleg azonos hatékonyságúnak bizonyult (a szinergizmus aránya kb. 70% volt mindkét esetben).

Korábbi vizsgálatok bizonyították, hogy a TRB nem okoz súlyos mellékhatásokat, széleskörű antifungális hatással rendelkezik, hatékonyan szívódik és halmozódik fel a szem szöveteiben, elérve a patogénnel szembeni hatékony koncentrációt (Liang és mtsai. 2009). A NTM felszívódó képessége gyengébb, de a fertőzések kezdeti stádiumában igen hatékony,

antifungális hatásspektruma szintén tág, toxicitása alacsony mértékű (Pradhan és mtsai. 2011, Dong és mtsai. 2012). Mindezek, valamint a két antifungális szer között *in vitro* vizsgálataink során fellépő szinergista kölcsönhatások viszonylag magas aránya alapján a NTM-TRB kombináció egy hatékony módja lehet a *Fusarium* keratitisz kezelésének.

#### **6.4. Illóolajok antifungális hatásának vizsgálata**

##### **6.4.1. Antimikrobiális tesztek mikrodilúcióval**

Összesen 9 illóolaj (borókaolaj, citromolaj, citromos eukaliptuszolaj, fahéjolaj, kakukkfűolaj, kúszó fajdbogyóolaj, majorannaolaj, muskotályzsályaolaj, teafaolaj) antifungális hatását vizsgáltuk 18, különböző fakomplexumhoz (FDSC, FIESC, FFSC, FOOSC, FSSC) tartozó indiai klinikai izolátummal szemben, *in vitro* mikrodilúciós teszttel. Az egyes illóolajokhoz tartozó MIC-értékeket a **11. táblázat** foglalja össze.

A vizsgált izolátumokkal szemben a fahéjolaj bizonyult a leghatékonyabbnak, 31,25-500 µg/ml közötti MIC-értékekkel. A GC-MS analízis alapján az általunk használt fahéjolaj fő komponense a fahéjaldehid (93,1%, **3. táblázat**) volt, ami a mikrodilúciós tesztekben a fahéjolajhoz hasonló, erős antifungális hatást mutatott (MIC-tartomány: 32,8-262,5 µg/ml). A fahéjolajhoz viszonyítva az összes többi illóolaj magasabb koncentráció-tartományban okozott teljes növekedésgátlást (MIC-tartomány: 225-53760 µg/ml). A kakukkfűolaj erős - mérsékelten erős aktivitást mutatott a vizsgált *Fusarium*-okkal szemben, 450-3600 µg/ml közötti MIC-értékekkel. A boróka- és teafaolaj (MIC-tartomány: 860-6880 és 900-7200 µg/ml) viszont mérsékelten erős - gyenge hatásúnak bizonyult. A citromos eukaliptusz- és majorannaolajok MIC-értékeiben nagy variabilitást tapasztaltunk: míg bizonyos izolátumokkal szemben erős antifungális hatást mutattak (MIC: 225 és 450 µg/ml), másokkal szemben csak gyenge hatást értek el (MIC: 3600 és 14400 µg/ml). A kúszó fajdbogyó-, muskotályzsálya- és citromolaj gyenge antifungális hatást mutatott valamennyi vizsgált izolátummal szemben (MIC  $\geq$ 1800 µg/ml). A citromolaj esetében tapasztaltuk a leggyengébb aktivitást (MIC-tartomány: 3360-53760 µg/ml). Az egyes fajkomplexumok illóolajok iránti érzékenységében nem tapasztaltunk jelentős eltérést.

11. táblázat: *Fusarium* izolátumok *in vitro* érzékenysége 9 illóolajjal és a fahéjolaj fő komponensével, a fahéjaldehiddel szemben. Pozitív kontrollként a natamicin (NTM) MIC-értékei szerepelnek a táblázatban.

Izolátum <sup>a</sup>	Fajkomplexum <sup>b</sup>	MIC-érték (µg/ml)										
		NTM	Boróka	Citrom	Citromos eukaliptusz	Fahéj	Fahéj-Aldehid	Kakukkfű	Kúszó fajdbogyó	Majoranna	Muskotály-zsálya	Teafa
SZMC 11497	FDSC	2	3440	6720	1800	62,5	32,8	900	4800	14400	3600	1800
SZMC 11499	FDSC	8	860	6720	1800	62,5	32,8	1800	4800	1800	3600	1800
SZMC 11501	FDSC	2	3440	13440	900	62,5	65,6	900	2400	3600	1800	1800
SZMC 11486	FFSC	256	3440	6720	450	125	65,6	1800	19200	1800	7200	1800
SZMC 11487	FFSC	128	6880	3360	450	62,5	65,6	900	19200	14400	1800	3600
SZMC 11488	FFSC	8	1720	6720	450	62,5	65,6	900	9600	14400	1800	7200
SZMC 11491	FFSC	64	3440	13440	1800	62,5	65,6	900	4800	3600	3600	1800
SZMC 11493	FFSC	4	3440	13440	3600	62,5	65,6	900	4800	14400	3600	3600
SZMC 11496	FFSC	4	3440	6720	900	31,25	32,8	900	4800	7200	1800	1800
SZMC 11403	FIESC	4	1720	6720	450	62,5	65,6	450	9600	3600	1800	900
SZMC 11481	FIESC	4	6880	26880	450	500	262,5	3600	2400	1800	3600	3600
SZMC 11489	FIESC	128	860	3360	225	62,5	65,6	900	4800	450	3600	900
SZMC 11483	FOSC	64	3440	6720	450	62,5	65,6	450	4800	900	1800	900
SZMC 11504	FOSC	8	1720	6720	450	125	65,6	900	38400	1800	3600	1800
SZMC 11505	FOSC	128	6880	6720	1800	62,5	65,6	450	38400	3600	1800	3600
SZMC 11515	FSSC	8	3440	53760	1800	125	131,25	3600	9600	3600	7200	3600
SZMC 21315	FSSC	16	3440	26880	900	62,5	131,25	1800	4800	900	3600	1800
SZMC 21328	FSSC	8	3440	26880	900	62,5	131,25	1800	2400	900	3600	1800
MIC <sup>c</sup> -tartomány		2-256	860-6880	3360-53760	225-3600	31,25-500	32,8-262,5	450-3600	2400-38400	450-14400	1800-7200	900-7200
MIC <sub>50</sub> <sup>d</sup>		8	3440	6720	900	62,5	65,6	900	4800	3600	3600	1800
MIC <sub>90</sub> <sup>e</sup>		128	6880	26880	1800	125	131,25	1800	19200	14400	3600	3600

<sup>a</sup>SZMC: Szeged Microbiological Collection, Szeged, Magyarország.

<sup>b</sup>FDSC: *F. dimerum* fajkomplexum; FFSC: *F. fujikuroi* fajkomplexum; FIESC: *F. incarnatum-equiseti* fajkomplexum; FOSC: *F. oxysporum* fajkomplexum; FSSC: *F. solani* fajkomplexum.

<sup>c</sup>MIC: minimális gátló koncentráció; <sup>d</sup>MIC<sub>50</sub>: minimális gátló koncentráció, ami a vizsgált izolátumok 50%-ánál (n=9) okozott teljes növekedésgátlást; <sup>e</sup>MIC<sub>90</sub>: minimális gátló koncentráció, ami a vizsgált izolátumok 90%-ánál (n=16) okozott teljes növekedésgátlást.



A fahéjolaj erős antifungális hatását már számos tanulmány bizonyította posztharveszt kártevő fajokkal (Xing és mtsai. 2010), növénypatogén *Fusarium*-okkal (Barrera-Necha és mtsai. 2009, Gömöri és mtsai. 2013) és humán patogén *Aspergillus*-okkal (Uniyal és mtsai. 2012) szemben. Eredményeinkhez (0,03-0,5 µl/ml) hasonlóan Ranasinghe és munkatársai (2002) *F. proliferatum*-mal szemben 0,5 µl/ml-es MIC-értéket írtak le.

A fahéjaldehid *Fusarium*-okkal szembeni antifungális hatását korábban Ooi és munkatársai (2006) vizsgálták, az általuk meghatározott MIC-értékek 75 és 150 µg/ml közötti értéktartományba estek.

A kakukkfűolaj antifungális hatását fonalgombákkal szemben több tanulmány is vizsgálta (Lee és mtsai. 2007, Soković és mtsai. 2008, Vitoratos és mtsai. 2013). Vitoratos és munkatársai (2013) *Penicillium* izolátumokkal szemben az általunk meghatározott MIC-értékekhez (0,5-4 µl/ml) képest alacsonyabb, 0,13 µl/ml-es értéket mértek.

A borókaolaj a Pepeljnjak és munkatársai (2005) által elvégzett kísérletekben az általunk megállapított értékekhez (2-8 µl/ml) képest szélesebb, 3,9-20 µl/ml-es tartományban gátolta dermatofiták növekedését; Gömöri és munkatársai (2013) tanulmányában szignifikánsan gátolta a növénypatogén *Fusarium culmorum* növekedését, viszont a *F. graminearum*-mal szemben hatástalannak bizonyult.

A teafaolaj gátló hatását szintén *F. culmorum*-mal és *F. graminearum*-mal szemben vizsgálták Terzi és munkatársai (2007). Kísérleteik során a teafaolaj jelenlétében szignifikánsan csökkent az izolátumok növekedése (MIC<sub>50</sub>: 23000 és 12000 µg/ml), habár a gátláshoz szükséges koncentráció-értékek az általunk tapasztaltakhoz képest lényegesen magasabbak voltak.

A citromos eukaliptuszolaj növénypatogénekkal és posztharveszt kártevőkkel végzett kísérletekben is hatékonynak bizonyult (Ramezani és mtsai. 2002, Lee és mtsai. 2007, Javed és mtsai. 2012). Ramezani és munkatársai (2002) növénypatogén *Fusarium* izolátumokon végzett kutatásai során 0,25-0,5 µl/ml közötti MIC-értékeket állapítottak meg, ami nagyjából megfelel az általunk tapasztalt értékeknek (0,25-4 µl/ml).

A majorannaolaj *Fusarium*-okkal szembeni aktivitását Leeja és Thoppil (2007), valamint Gömöri és munkatársai (2013) is leírták a közelmúltban.

A kúszó fajdbogyóolaj *Fusarium*-ok elleni növekedésgátló hatását korábban még nem írták le a szakirodalomban. A muskotályzsályaolaj aktivitását Dzamic és munkatársai (2007), valamint Gömöri és munkatársai (2013) is vizsgálták. Gömöri és munkatársai (2013) eredményei alapján az olaj hatásosnak bizonyult *F. culmorum*-mal szemben. Dzamic és munkatársai (2007) az általunk megállapított MIC-értékekhez (2-8 µl/ml) képest magasabb,

15-20 µl/ml-es értékeket írtak le *Fusarium tricinctum*-mal és *Fusarium sporotrichioides*-szel szemben.

A citromolaj bizonyítottan gátolta különböző fonalgombák csírázását és növekedését (Viuda-Martos és mtsai. 2008, Vitoratos és mtsai. 2013), viszont az általunk leírtakhoz hasonlóan, más illóolajokhoz viszonyítva gyengébb antifungális hatással rendelkezett (El-Zemity és Ahmad 2005, Chuah és mtsai. 2010, Gömöri és mtsai. 2013).

#### **6.4.2. Illóolaj-komponens - antifungális szer kombinációk *in vitro* növekedésgátló hatása**

A továbbiakban a NTM és a fahéjaldehid különböző koncentrációban összemért kombinációinak *Fusarium*-okkal szembeni gátló hatását és a két hatóanyag között létrejövő kölcsönhatás típusát vizsgáltuk. A kísérletek során felhasznált törzsek megegyeztek a **6.4.1. pontban** vizsgált 18, humán keratitiszből származó törzssel. A FICI alapján szinergista kölcsönhatást mindössze egy alkalommal (**8. ábra**), az FFSC SZMC 11486 izolátum esetében figyeltünk meg. Az esetek többségében (n=17) nem tapasztaltunk kölcsönhatást a két szer között. Ennek ellenére a fahéjaldehid és a NTM együttes alkalmazásával fokozott növekedésgátló hatást értünk el: a vizsgált hatóanyagok önálló alkalmazásukhoz képest már alacsonyabb koncentrációban is a *Fusarium* izolátumok teljes gátlását okozták. Így például a NTM önmagában 128 µg/ml koncentrációban gátolta a vizsgált izolátumok 90%-át (MIC<sub>90</sub>), ezzel szemben fahéjaldehid jelenlétében a MIC<sub>90</sub> érték 8 µg/ml volt (**12. táblázat**). Habár antagonista kölcsönhatást nem figyeltünk meg a NTM és fahéjaldehid között, az FDSC SZMC 11496 törzs esetében tapasztalt FICI-érték (4,00) az antagonista és indifferens kölcsönhatás határértékének felel meg.

A NTM és a fahéjaldehid kombinációjának *in vitro* antifungális hatását korábban még nem vizsgálták. Kim és munkatársai (2011) megállapításai szerint a benzaldehyde, így a fahéjaldehid is direkt antifungális hatásuk mellett a mikrobák kemoszenzitivitásának fokozásával növelhetik a konvencionális antifungális szer alapú terápiák (pl. AMB) hatékonyságát. Eredményeink is alátámasztják a Kim és munkatársai (2011) által leírt jelenséget. Habár kísérleteink során a NTM és fahéjaldehid között főleg indifferens kölcsönhatást figyeltünk meg, a rendkívül magasnak tekinthető NTM MIC-értékek (64-256 µg/ml), a fahéjaldehid jelenlétében ≤16 µg/ml-re csökkentek, ami megfelel a szem szöveteiben elérhető terápiás NTM koncentrációnak (Lalitha és mtsai. 2008a).

12. táblázat: A natamicin és fahéjaldehid kombinációjának hatása a *Fusarium* izolátumok *in vitro* növekedésére.

Izolátum	Fajkomplexum <sup>b</sup>	MIC-értékek (µg/ml) <sup>c</sup>				FICI <sup>d</sup>	Kölcsönhatás típusa <sup>e</sup>
		NTM <sub>egyedül</sub>	NTM <sub>komb</sub>	Fahéjaldehid <sub>egyedül</sub>	Fahéjaldehid <sub>komb</sub>		
SZMC 11496	FDSC	2	4	32,8	65,6	4,00	NK
SZMC 11499	FDSC	8	2	32,8	32,8	1,25	NK
SZMC 11501	FDSC	2	4	65,6	65,6	3,00	NK
<b>SZMC 11486</b>	<b>FFSC</b>	256	8	65,6	16,4	0,28	<b>SZ</b>
SZMC 11487	FFSC	128	4	65,6	131,25	2,03	NK
SZMC 11488	FFSC	8	4	65,6	65,6	1,50	NK
SZMC 11491	FFSC	64	2	65,6	65,6	1,03	NK
SZMC 11493	FFSC	4	2	65,6	131,25	2,50	NK
SZMC 11497	FFSC	4	2	32,8	65,6	2,50	NK
SZMC 11403	FIESC	4	4	65,6	65,6	2,00	NK
SZMC 11481	FIESC	4	4	262,5	65,6	1,25	NK
SZMC 11489	FIESC	128	4	65,6	131,25	2,03	NK
SZMC 11483	FOSC	64	16	65,6	32,8	0,75	NK
SZMC 11504	FOSC	8	4	65,6	65,6	1,50	NK
SZMC 11505	FOSC	128	1	65,6	65,6	1,01	NK
SZMC 11515	FSSC	8	4	131,25	32,8	0,75	NK
SZMC 21315	FSSC	16	16	131,25	32,8	1,25	NK
SZMC 21328	FSSC	8	4	131,25	65,6	1,00	NK
<b>MIC<sup>f</sup>-tartomány</b>		2-256	1-16	32,8-262,5	16,4-131,25		
MIC <sub>50</sub> <sup>g</sup>		8	4	65,6	65,6		
MIC <sub>90</sub> <sup>h</sup>		128	8	131,25	131,25		

<sup>a</sup>SZMC: Szeged Microbiological Collection, Szeged, Magyarország.

<sup>b</sup>FDSC: *F. dimerum* fajkomplexum; FFSC: *F. fujikuroi* fajkomplexum; FIESC: *F. incarnatum-equiseti* fajkomplexum; FOSC: *F. oxysporum* fajkomplexum; FSSC: *F. solani* fajkomplexum.

<sup>c</sup>NTM<sub>egyedül</sub> és Fahéjaldehid<sub>egyedül</sub>: a natamicin és fahéjaldehid önálló alkalmazásakor mért MIC-értékek; NTM<sub>komb</sub> és Fahéjaldehid<sub>komb</sub>: a natamicin és fahéjaldehid kombinált alkalmazása során mért MIC-értékek.

<sup>d</sup>FICI: fractional inhibitory concentration index, frakcionális gátló koncentráció index.

<sup>e</sup>SZ: szinergista kölcsönhatás (FICI ≤ 0,5), kék kerettel jelölve; NK: nincs kölcsönhatás (0,5 < FICI ≤ 4).

<sup>f</sup>MIC: minimális gátló koncentráció; <sup>g</sup>MIC<sub>50</sub>: minimális gátló koncentráció, ami a vizsgált izolátumok 50%-ánál (n=9) okozott teljes növekedésgátlást; <sup>h</sup>MIC<sub>90</sub>: minimális gátló koncentráció, ami a vizsgált izolátumok 90%-ánál (n=16) okozott teljes növekedésgátlást.

A)		Fahéjaldehid koncentráció, µg/ml					
		525	262,5	131,25	65,6	32,8	16,4
NTM koncentráció,	128	8,50	4,50	2,50	1,50	1,00	0,75
	64	8,25	4,25	2,25	1,25	0,75	0,50
	32	8,13	4,13	2,13	1,13	0,63	0,38
	16	8,07	4,06	2,06	1,06	0,56	0,31
	8	8,03	4,03	2,03	1,03	0,53	0,28
	4	8,02	4,02	2,02	1,02	0,52	0,27
	2	8,01	4,01	2,01	1,01	0,51	0,26

B)		Fahéjaldehid koncentráció, µg/ml					
		525	262,5	131,25	65,6	32,8	16,4
NTM koncentráció, µg/ml	128	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	64	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	32	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	16	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0	0,0	10,6	83,0	0,52	88,3
	2	0,0	0,0	33,0	78,5	86,2	87,3

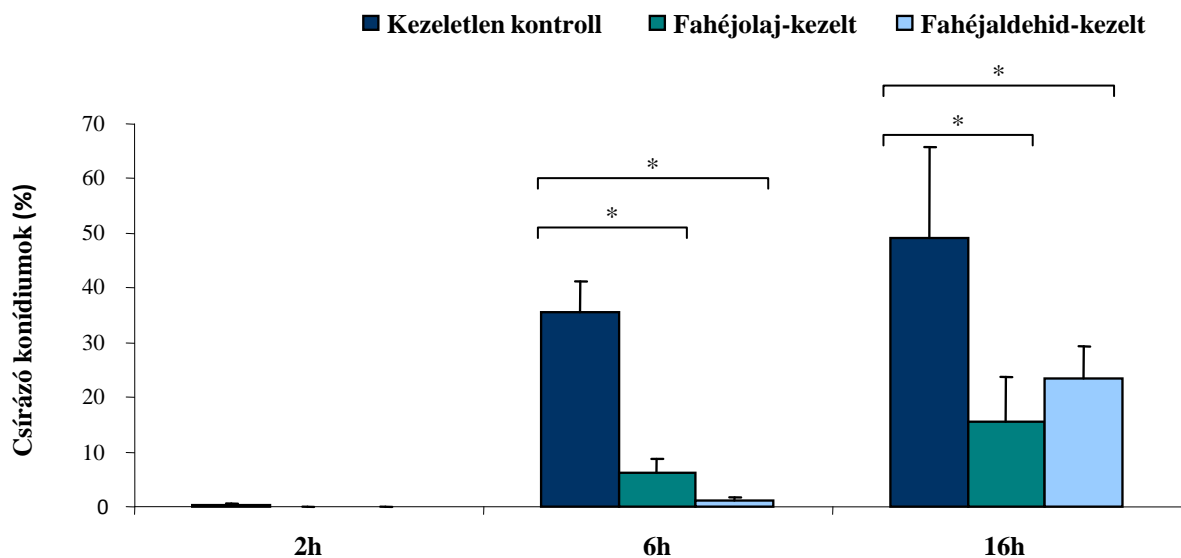
**8. ábra: A hatóanyag kombinációs tesztek során checkerboard titrálással összemért mikrotiter lemezek sematikus ábrája.** (A) Az egyes mintahelyeken az adott kombinációra számolt FICI-értékek találhatóak. Pirossal az antagonista ( $FICI > 4$ ), kékkel a szinergista ( $FICI \leq 0,5$ ), feketével az indifferens ( $0,5 < FICI \leq 4$ ) kombinációkat jelöltük. (B) Az egyes mintahelyeken az FSSC SZMC 11486 izolátum esetében mért átlagos növekedési százalékos értékek olvashatók. A kék keret a leghatékonyabb kombinációt jelöli ( $FICI = 0,28$ ). **NTM:** natamicin.

### 6.4.3. Illóolajok okozta morfológiai változások mikroszkópos vizsgálata

A fahéjolaj és fő komponense, a fahéjaldehid antifungális hatását az FSSC SZMC 21315 izolátummal szemben fény- és fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Ehhez a mikrodilúciós tesztek alapján egy olyan koncentrációt (0,15 µl/ml, ami a fahéjolaj esetében 15 µg/ml-nek, a fahéjaldehid esetében 16,4 µg/ml-nek felel meg) választottunk, amely hatékonyan gátolta az izolátum növekedését, de nem okozott teljes gátlást.

Fénymikroszkópos megfigyeléseink alapján a fahéjolaj és a fahéjaldehid késleltette vagy gátolta a vizsgált izolátum konídiumainak csírázását. A **9. ábra** alapján a csírázó konídiumok aránya a kezeltlen tenyészetekhez viszonyítva a 6 és 16 órás kezelt mintákban szignifikánsan

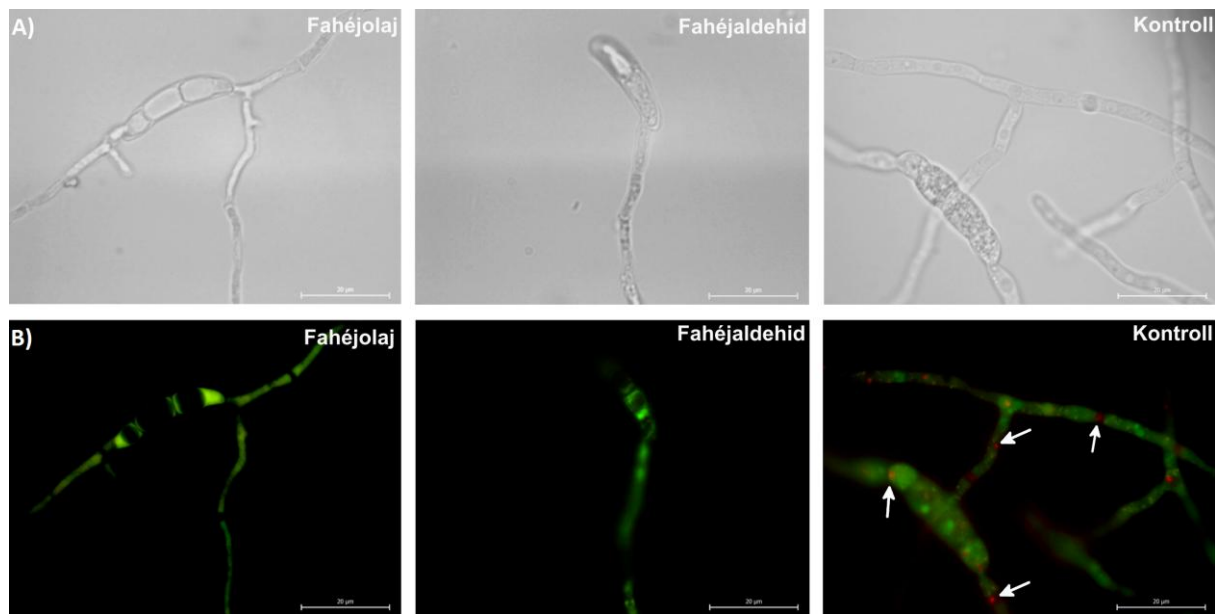
kisebb volt. Hat óra elteltével a csíratömlő kialakulását a kezeletlen konídiumok  $35,7 \pm 5,4\%$ -ánál, a fahéjolajjal kezelt konídiumok  $6,3 \pm 2,4\%$ -ánál, és fahéjaldehiddel kezelt konídiumok  $1,0 \pm 0,7\%$ -ánál figyeltük meg. Tizenhat óra elteltével minden esetben magasabb csírázási arányt tapasztaltunk: a kezeletlen konídiumok esetében ez  $49,0 \pm 16,7\%$ , a fahéjolajjal és fahéjaldehiddel kezelt konídiumok esetében pedig  $15,6 \pm 8,2$  és  $23,3 \pm 6,0\%$  volt.



<b>Kontroll</b>	$0,3 \pm 0,15$	$35,7 \pm 5,4$	$49,0 \pm 16,7$
<b>Fahéjolaj-kezelt</b>	$0^{n.s.}$	$6,3 \pm 2,4^*$	$15,6 \pm 8,2^*$
<b>Fahéjaldehid-kezelt</b>	$0^{n.s.}$	$1,0 \pm 0,7^*$	$23,3 \pm 6,0^*$

**9. ábra: A fahéjolaj és fahéjaldehid (0,015  $\mu$ l/ml) hatása a konídiumok csírázására 2, 6 és 16 órás, 25 °C-on történő inkubációt követően.** <sup>n.s.</sup>Statistikailag nem szignifikáns különbség a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. \*Statistikailag szignifikáns különbség a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva ( $p < 0,05$ ). Az átlagos százalékértékek és a hozzájuk tartozó szórások három párhuzamosan végzett kísérletből származnak.

A fahéjolajjal és fahéjaldehiddel kezelt konídiumok életképességének és metabolikus aktivitásának vizsgálatára *FUN1* fluoreszcens festést alkalmaztunk. A kezeletlen kontroll minta esetében a konídiumok és a hifák zöld, a vakuoláris struktúrák pedig a metabolikus aktivitásra utaló piros fluoreszcenciát mutattak. Ezzel szemben a kezelt mintákban nem észleltünk pirosan festődő vakuólumokat, a konídiumok az élő, de metabolikusan nem aktív, zöld vagy a holt sejtekre jellemző sárgászöld festődést mutatták (**10. ábra**). A vizsgált időpontok mindegyikében, vagyis 2, 6 és 16 óra elteltével is ugyanezt a hatást tapasztaltuk.

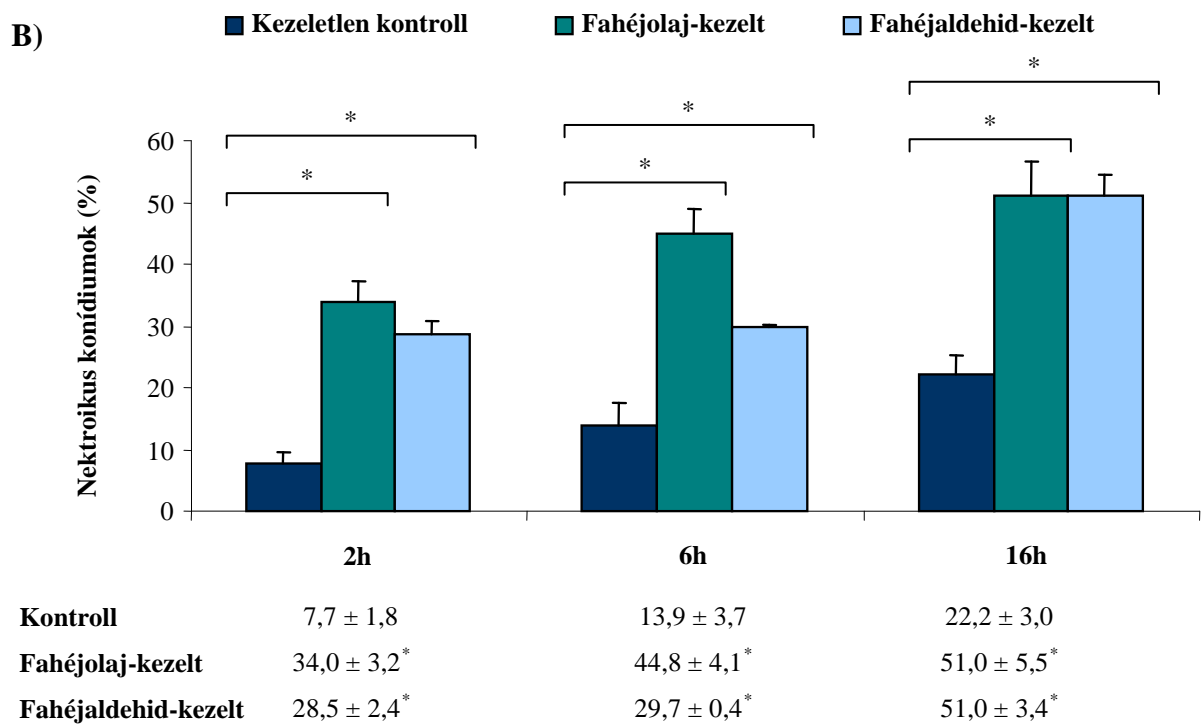
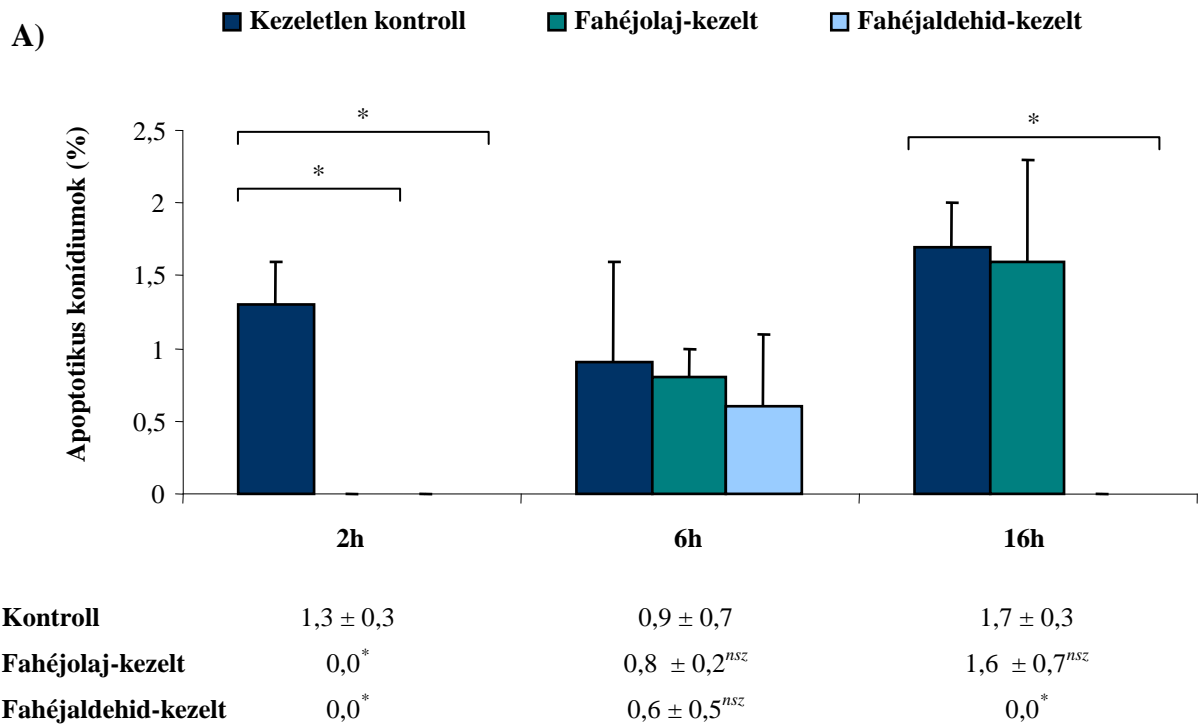


**10. ábra:** Az FSSC SZMC 21315 izolátum *FUNI* fluoreszcens festékkel festett, kezeletlen, valamint 0,015-0,015  $\mu\text{l/ml}$  fahéjolajjal, illetve fahéjaldehiddel kezelt csírázó konídiumai 16 óra, 25 °C-on történő inkubációt követően. (A) Fénymikroszkópos és (B) fluoreszcens mikroszkópos felvételek. A nyilak a plazmamembrán integritására és a sejt metabolikus aktivitására utaló piros fluoreszcenciájú vakuólumokat jelzik. Az egységek hossza 20  $\mu\text{m}$ .

Az *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* alkalmazásával meghatároztuk a kezelt és kezeletlen mintákban előforduló apoptotikus és nekrotikus sejtek arányát. A fahéjolajjal és fahéjaldehiddel történő kezelés szignifikánsan csökkentette az élő konídiumok arányát a vizsgált mintákban. A nekrotikus festődést mutató konídiumok száma az inkubációs idővel együtt emelkedett (**11. ábra**). A kezeletlen kontrollhoz viszonyítva már két óra elteltével is szignifikánsan magasabb volt a nekrotikus konídiumok száma a kezelt mintákban (fahéjolaj:  $34,0 \pm 3,2\%$ , fahéjaldehid:  $28,5 \pm 2,4\%$ ), 16 óra elteltével pedig a kezelt konídiumok mintegy fele mutatott nekrotikus fenotípust (fahéjolaj:  $51,0 \pm 5,5\%$ , fahéjaldehid:  $51,0 \pm 3,4\%$ ).

Az apoptotikus, azaz zöld festődésű konídiumok aránya a kezelt és kezeletlen mintákban is rendkívül alacsony volt ( $<2\%$ , **11. ábra**).

A mikroszkópos vizsgálatok alapján tehát fahéjolaj és fahéjaldehid jelenlétében csökkent a *Fusarium* konídiumok életképessége, metabolikus aktivitása, szignifikánsan csökkent a csírázókéességük és szignifikánsan emelkedett a nekrotikus események száma. Hasonlóképpen Rao és munkatársai (2010) *Saccharomyces cerevisiae*-ben figyelték meg a metabolikus aktivitás csökkenését illóolajok terpenoid fenol összetevőinek jelenlétében.



**11: ábra:** Az *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* segítségével meghatározott (A) apoptotikus és (B) nekrotikus festődést mutató konídiumok aránya fahéjolajjal és fahéjaldehiddel történő 2, 6 és 16 órás kezelést követően. <sup>nsz</sup>Statistikailag nem szignifikáns különbség a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. \*Statistikailag szignifikáns különbség a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva ( $p < 0,05$ ). Az átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások három párhuzamosan végzett kísérletből származnak.

Ezt megelőzően a fahéjolaj és fahéjaldehid hatásmechanizmusát *Fusarium*-okon még nem vizsgálták. Kim és munkatársai (2011) megfigyelései alapján a benzaldehidek - köztük a fahéjaldehid is - hatékonyan gátolták az *Aspergillus fumigatus* növekedését, célpontjaik a sejt antioxidáns enzimszisztémájának komponensei (pl. szuperoxid-dizmutáz, glutation-reduktáz) voltak. Az illóolajok egy másik lehetséges célpontja a sejtfa és a sejtmembrán. Kísérleteink során a membrán-impermeábilis PI szignifikánsan nagyobb arányban festette a kezelt konídiumokat, ezért feltételezhetjük, hogy a fahéjolaj és a fahéjaldehid a membrán roncsolásán keresztül fejt ki hatását. Élesztőkben kimutatták, hogy a fahéjaldehid gátolta a sejtfa szintézis enzimjeit (Bang és mtsai. 2000). Carmo és munkatársai (2008) fahéjolaj-kezelést követően a sejtfa integritás megszűnésére utaló jeleket tapasztaltak *Aspergillus*-okon. Egy másik kísérlet során transzmissziós és pásztázó elektronmikroszkóp segítségével megfigyelték, hogy fahéjaldehid hatására az *A. fumigatus* sejtmembránjában és sejtfaán egyaránt pórusok képződtek, majd citoplazma hiányában a hifák összeestek és a sejtek alakja is megváltozott a kezeltlen tenyészetéhez képest (Khan és Ahmad 2011).

Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy az illóolajok, illetve komponenseik, különösen a fahéjolaj és a fahéjaldehid, ígéretes alapot szolgáltathatnak egy új, a *Fusarium* keratitisz kezelésére alkalmas antifungális terápia kifejlesztéséhez. Az illóolajok vagy komponenseik klinikai alkalmazhatóságának bizonyítására további *in vitro* és *in vivo* tesztek szükségesek. Az illóolajok szem szöveteire gyakorolt toxikus hatásáról egyelőre kevés információ áll a rendelkezésünkre. A kúszó fajdbogyóolaj humán epitelsejteken vizsgálva  $\leq 100$   $\mu\text{g/ml}$  koncentrációban enyhén toxikusnak bizonyult, magasabb koncentráció-tartományban fokozott toxicitást mutatott (Söderberg és mtsai. 1996). Az általunk tapasztalt 2400 és 38400  $\mu\text{g/ml}$  közötti MIC-értékek jelentősen meghaladták a Söderberg és munkatársai (1996) által enyhén toxikusnak ítélt koncentrációt, a fajdbogyóolaj klinikai alkalmazhatósága ezért megkérdőjelezhető. Az egyes illóolajok komponensei, illetve ezek származékai ígéretesebb antifungális szerek lehetnek a jövőben. Shreaz és munkatársai (2011) kutatásai alapján a fahéjaldehid-származékok patkány mioblastsejtekre kifejtett toxicitása kisebb, viszont *Candida* fajokkal szembeni antifungális hatásuk erősebb volt a kiindulási molekulához viszonyítva.

## **6.5. *Fusarium solani* fajkomplexumhoz tartozó izolátumok extracelluláris enzim termelésének vizsgálata**

Casadevall (2006) szerint a talajban élő mikrobák számos olyan tulajdonsággal rendelkeznek, amelyek természetes élőhelyükön a túlélésüket segítik, adott körülmények



között viszont az állati/humán fertőzések kialakításában szerepet játszó virulenciafaktoroknak tekinthetők. A mikrobák virulenciája eltérő mértékű, amelyet a különböző virulenciafaktorok egyedi kombinációja határoz meg. Köztük a legáltalánosabbak az enzimek, melanin, toxinok, adhezinek termelése és a termotolerancia.

A *Fusarium* fertőzésekből leggyakrabban izolált fajkomplexum az FSSC, ezért vizsgálataink során arra szeretnénk volna választ kapni, hogy a fajkomplexum humán fertőzésből származó izolátumai rendelkeznek-e egy olyan, jellegzetes enzimaktivitási profillal, ami megkülönbözteti őket a környezetből (talaj vagy növény) származó izolátumoktól. Ezek az enzimek esetleges virulenciafaktorokként jöhetnek szóba. Ennek érdekében összesen 67 FSSC izolátum, köztük 23 indiai klinikai, 19 indiai talajból származó, 11 indiai növényről származó és további 14, különböző földrajzi régiókból származó növényi izolátum extracelluláris celluláz, elasztáz, foszfolipáz, kazeináz, keratináz, lipáz és pektináz aktivitását teszteltük és hasonlítottuk össze. Eredményeinket a **12. ábra** foglalja össze, a részletes, izolátumokra lebontott eredményeket pedig a **3. melléklet** tartalmazza.

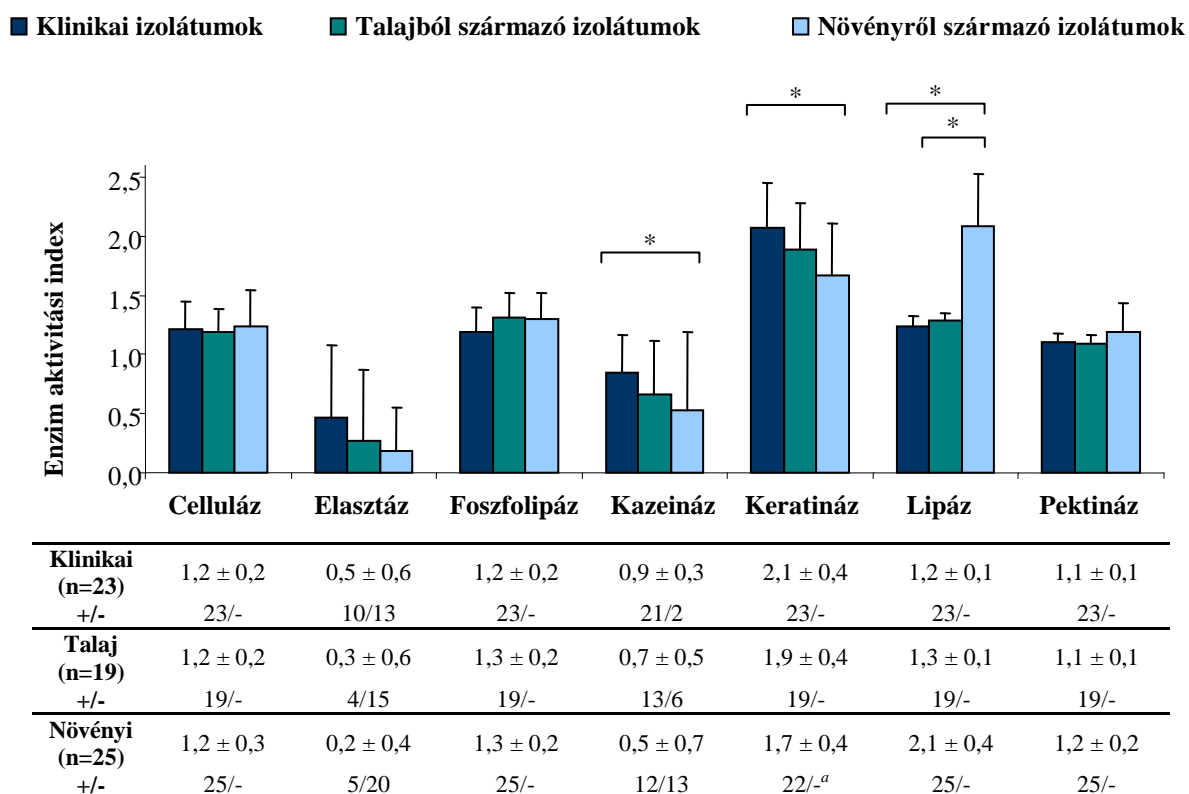
Kísérleteink során nemcsak a humán patogenitásban potenciálisan szerepet játszó enzimeket vizsgáltuk. Arra is kíváncsiak voltunk, hogy a növénypatogenitásban nagyobb szerepet játszó enzimek, mint például a celluláz, pektináz és lipáz (Babalola 2010, Voigt és mtsai. 2005) termelésére képesek-e a klinikai izolátumok és ha igen, van-e aktivitásbeli különbség a klinikai és környezeti forrásból származó izolátumok között.

Eredményeink alapján a klinikai, talajból és növényekről származó izolátumok mindegyike rendelkezett celluláz és pektináz aktivitással, viszont szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk a különböző csoportok enzimaktivitásában. A növényekről származó izolátumok átlagos pektináz aktivitása csak kis mértékben bizonyult magasabbnak (EAI:  $1,2 \pm 0,2$ ) a klinikai és talajból származó izolátumok (EAI:  $1,1 \pm 0,1$ ) enzimaktivitásánál.

A három vizsgált csoport elasztáz aktivitása is közel azonos volt. A tapasztalt különbségek ebben az esetben sem bizonyultak szignifikánsnak, ennek ellenére a klinikai és növényi izolátumok között viszonylag nagyobb enzimaktivitásbeli eltérést tapasztaltunk. A vizsgált izolátumok kevesebb mint fele rendelkezett elasztáz aktivitással: a klinikai izolátumok közül 10, a talajból és növényekről származó izolátumok közül pedig 4, illetve 5 izolátum bontotta a táptalajhoz adott elasztint.

A foszfolipáz termelésére az általunk vizsgált valamennyi izolátum képes volt. A klinikai, talajból és növényekről származó izolátumok megközelítőleg azonos aktivitást mutattak a tesztek során (EAI:  $1,2 \pm 0,2$ ;  $1,2 \pm 0,2$ ;  $1,3 \pm 0,2$ ).

A kazein bontására a klinikai csoportból mindössze két izolátum nem volt képes. A talajból származó izolátumok többsége (n=13) és a növényekről származó izolátumok mintegy fele (n=12) rendelkezett kazeináz aktivitással. A klinikai ( $0,9 \pm 0,3$ ) és növényi ( $0,5 \pm 0,7$ ) izolátumok kazeináz aktivitása közötti eltérés szignifikánsnak bizonyult (**12. ábra, 3. melléklet**).



**12. ábra: Klinikai és környezeti *F. solani* fajkomplexum (FSSC) izolátumok extracelluláris enzimaktivitásai.** \* Statisztikailag szignifikáns különbség ( $p < 0,05$ ). +/-: extracelluláris enzimaktivitással rendelkező/nem rendelkező izolátumok száma. <sup>a</sup>: a keratináz aktivitást csak 22 növényi izolátum esetében teszteltük.

Mindhárom csoport rendelkezett extracelluláris lipáz aktivitással. A növényekről származó izolátumok esetében kiemelkedően magas enzimaktivitási indexet kaptunk (EAI:  $2,1 \pm 0,4$ ). Ez az érték közel kétszerese volt a klinikai és talajból származó izolátumok aktivitásának (EAI:  $1,2 \pm 0,1$  és  $1,3 \pm 0,1$ ).

Az általunk vizsgált izolátumok mindegyike rendelkezett extracelluláris keratináz termelésére való képességgel. A talajból származó izolátumok enzimaktivitása megközelítőleg azonos volt a klinikai izolátumok aktivitásával (EAI:  $1,9 \pm 0,4$  és  $2,1 \pm 0,4$ ), a klinikai és növényi (EAI:  $1,7 \pm 0,4$ ) izolátumok aktivitása között azonban szignifikáns

különbséget tapasztaltunk. Ennek ellenére mind a talajból, mind a növényekről származó izolátumok esetében tapasztaltunk a klinikai izolátumokéhoz hasonló, magas enzimaktivitási index értékeket (**3. melléklet**).

Összefoglalva eredményeinket elmondhatjuk, hogy a különböző forrásból származó izolátumok extracelluláris celluláz, elasztáz és pektináz aktivitásában nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. A növényi mintából származó izolátumok mind a klinikai, mind a talajból származó izolátumokhoz képest kiemelkedően magas lipáz aktivitással rendelkeztek. Ezzel szemben a humánpatogén izolátumok kazeináz és keratináz aktivitása szignifikánsan magasabbnak bizonyult a növényekről izolált törzsek esetében mért értékeknél.

Sav és munkatársai (2016) 12 szemfertőzésből származó *Fusarium* izolátum (6 FDSC, 3 FSSC, 2 FFSC, 1 FCOSC) savas proteínáz és foszfolipáz aktivitását határozták meg. Eredményeinkhez hasonlóan az általuk vizsgált izolátumok mindegyike rendelkezett foszfolipáz aktivitással, viszont proteínázt csak öt esetben, 3 FDSC és 2 FSSC izolátum esetében tapasztaltak. A proteínázok a szem sztrómáját roncsolják és ezzel a szem fekélyesedését okozzák, a foszfolipázok pedig a membránlipidek, pontosabban a glicerofoszfolipidek észterkötéseit hasítják, ezzel segítve a kórokozó szöveti invázióját a fertőzés során (Sav és mtsai. 2016). Egy szintén szemfertőzésből származó FSSC izolátum szerin-proteáz termelését *in vitro* majd *in vivo* körülmények között is vizsgálva Gopinathan és munkatársai (2001) arra a következtetésre jutottak, hogy az enzim nem a szöveti degradációban, hanem a szaruhártya vagy az inflammatórikus sejtek aktiválásában játszhat fontosabb szerepet. Nayak és munkatársai (2010) keratitiszből származó *Aspergillus* és *Fusarium* fajokon végzett kísérleteik alapján a fonalgombák által termelt proteínázokat a keratomikózis fontos virulencia-markereként írták le. A foszfolipázok virulenciában betöltött szerepét eddig *Candida albicans* esetében bizonyították, hatásukat feltételezhetően a sejt lízisével fejtik ki (Ghannoum 2000).

Jelenleg négy olyan tanulmány áll rendelkezésünkre, amelyekben a Dél-Indiában, egész pontosan a coimbatore-i *Aravind Eye Hospital & Postgraduate Institute of Ophthalmology* mikrobiológiai laboratóriumában izolált fonalgomba törzsek extracelluláris enzimaktivitása és a virulencia közötti összefüggéseket vizsgálták (Krizsán 2012, Gopal és mtsai. 2013, Mythili és mtsai. 2014, Panneer Selvam és mtsai. 2014).

Panneer Selvam és munkatársai (2014) összesen 154 *Aspergillus* és *Fusarium* izolátum extracelluláris enzimaktivitását határozták meg, majd eredményeiket összevetették a klinikai esetleírásokkal. Az *Aspergillus*-okhoz képest a *Fusarium*-ok nagyobb számban termeltek celluláz és lipáz enzimeket, viszont proteáz és  $\alpha$ -amiláz aktivitással kevesebb *Fusarium*

izolátum rendelkezett. A DNáz, elasztáz és keratináz aktivitás mind a két nemzetség képviselői körében alacsonyabb mértékű volt. Az egyes esetek klinikai képét összehasonlítva a kórokozó extracelluláris enzimaktivitási profiljával Panneer Selvam és munkatársai (2014) megállapították, hogy a betegség súlyossága összefüggésben állhat a proteáz és lipáz aktivitás mértékével. Eredményeinket összehasonlítva az egyik leglényegesebb különbség, hogy az általunk vizsgált izolátumok mindegyike rendelkezett keratináz aktivitással, és a klinikai és növényi minták közötti szignifikáns különbség alapján feltételezzük, hogy a keratináz enzim szerepet játszhat a *Fusarium* keratitisz kialakításában. Megjegyzendő, hogy Panneer Selvam és munkatársai (2014) a keratináz aktivitási tesztek az általunk leírt módszertől eltérően végezték el, az eredményeink közötti eltérés a módszertani különbségekből fakadhat.

Mythili és munkatársai (2014) 30 klinikai *Fusarium* izolátum extracelluláris enzimaktivitását vizsgálták és vetették össze egy talajból származó *Fusarium* aktivitásával. Eredményeik alapján a klinikai izolátumok többsége rendelkezett lipáz (n=28), proteáz (n=22), celluláz és pektináz (n=28) aktivitással. A klinikai és talajból származó izolátumok celluláz és proteáz aktivitása között statisztikailag szignifikáns különbséget állapítottak meg. Ezzel ellentétben kísérleteinkben a két csoport között nem tapasztaltunk jelentős aktivitásbeli különbséget egy vizsgált enzim esetében sem. Hasonlóan Gopal és munkatársai (2013) is közel azonos enzimaktivitási indexeket állapítottak meg az általuk vizsgált klinikai és talajból származó izolátumok között. Habár kísérleteik során a talajból származó izolátumok proteáz aktivitása a klinikai izolátumokéhoz viszonyítva kis mértékben magasabbnak adódott, a különbség nem bizonyult szignifikánsnak.

Krizsán (2012) keratitiszből származó *Bipolaris* fajok extracelluláris enzimaktivitását vizsgálva az elasztáz aktivitást említi, mint a keratitiszben potenciálisan szerepet játszó virulenciafaktort. Ezzel ellentétben az általunk vizsgált 7 enzim közül a *Fusarium*-ok az elasztáz aktivitás tesztekben mutatták a legalacsonyabb aktivitást (**12. ábra**).

Mindezek alapján feltételezhetjük, hogy a *Fusarium*ok által termelt extracelluláris enzimek szerepet játszhatnak a szaruhártya-gyulladás kialakításában. Vizsgálataink során klinikai szempontból jelentős eltérést egyedül a keratináz és kazeáz aktivitásban mutattunk ki. Lehetségesnek tartjuk, hogy nem egy kitüntetett enzim, hanem több extracelluláris enzim és egyéb virulencia faktorok (pl. biofilm képzés, toxin-termelés) együttese szükséges egy sikeres humán fertőzés kialakításához. Mindezek bizonyítására azonban további vizsgálatok szükségesek.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Fusarium* nemzetség a hialin (áttetsző falú) fonalgombák egy jelentős csoportja. Alapvetően talajban élő szaprofita mikroorganizmusok, ritkábban növényi, állati és humán megbetegedésekkel hozhatók összefüggésbe. Dél-Indiában a legfrissebb felmérések alapján a felnőtt és a tizenhat év alatti lakosság körében egyaránt a *Fusarium* fajok felelősek a keratomikózisok túlnyomó többségéért. Az egyes fajkomplexumok antifungális szerek iránti érzékenysége eltérő lehet. Emellett a nemzetség képviselői, különösen az FSSC tagjai gyakran rezisztenciát mutatnak a konvencionális antifungális szerekkel szemben. Ennek következtében a *Fusarium* keratitisz kezelése továbbra is kihívást jelent az orvostudomány számára. A kórokozó félreazonosítása következtében alkalmazott, nem megfelelő antifungális terápia akár a beteg látásának elvesztéséhez is vezethet. A kórokozó átfogó vizsgálata során szerzett ismeretek alapján megalkotott új molekuláris azonosítási módszerek és alternatív terápiás stratégiák alkalmazása a klinikai gyakorlatban hozzájárulhatnak a *Fusarium* keratitisz gyors diagnosztizálásához és célzott kezeléséhez.

Mindezek alapján munkánk kezdetekor az alábbi főbb célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- humán keratitiszből származó *Fusarium* izolátumok molekuláris azonosítása, filogenetikai analízise;
- egy új, megbízható FSSC-specifikus azonosítási módszer kidolgozása;
- klinikai *Fusarium* izolátumok antifungális szerek iránti érzékenységének vizsgálata;
- illóolajok *Fusarium*-okkal szembeni gátló hatásának vizsgálata;
- klinikai *Fusarium* izolátumok antifungális hatású anyagok (antifungális szer + antifungális szer, antifungális szer + illóolaj-komponens) kombinációival szembeni érzékenységének vizsgálata;
- klinikai, talaj- és növényi fertőzésből származó FSSC izolátumok extracelluláris enzimaktivitásainak összehasonlítása.

Főbb eredményeinket az alábbi pontokban foglalhatjuk össze:

### **1. Humán keratitiszből származó *Fusarium* izolátumok molekuláris azonosítása, filogenetikai analízise.**

Összesen 70 humán keratitiszből származó izolátumot azonosítottunk a *TEF1* és *TUB* génszakaszok nukleotidszekvenciája alapján, majd a két génszakasz bevonásával Bayes-féle és *Maximum Likelihood* módszerrel filogenetikai analízist végeztünk. A becsült törzsfán a

klinikai *Fusarium* izolátumok fajkomplexumonként öt magas támogatottsági értékekkel rendelkező kládba csoportosultak. A filogenetikai analízis egy kivétellel megerősítette a szekvenciaalapú azonosítás eredményeit: az egyik *TEF1* és *TUB* szekvenciák alapján FOOSC-hez sorolt izolátum a törzsfán az FFOSC részét képezte. Mindezek alapján a 70 izolátumból 53 az FSSC, 6-6 az FDOSC és FFOSC, 3 az FOOSC és 2 az FIOSC fajkomplexum képviselőjének bizonyult. Fajszínten 8 izolátumot azonosítottunk: az FDOSC-n belül valamennyi izolátum *F. delphinoides*-nek, az FFOSC-n belül 3 izolátum *F. napiforme*-nak bizonyult. A fent említett fajkomplexumok mindegyikét leírták már humán keratomikózisból, viszont a *F. napiforme*-t a világon elsőként azonosítottuk, mint humán keratitiszt okozó fajt.

## **2. Egy új, megbízható FSSC-specifikus azonosítási módszer kidolgozása.**

*In silico* vizsgálataink alapján a *Fusarium* nemzetségen belül egyedül az FSSC izolátumok *TEF1* szakaszai hordozzák az *EcoRI* restrikciós endonukleáz specifikus felismerőhelyét. Mindezt kísérletesen is bizonyítottuk: 80 klinikai és környezeti *Fusarium* izolátum *TEF1* szakaszát emésztettük *EcoRI*-el. Az emésztési reakciók valamennyi FSSC izolátum esetében két, a vártnak megfelelő méretű fragmentumot eredményeztek. Fals negatív vagy fals pozitív eredményeket nem kaptunk. Módszerünk hatékonyságát összevetettük egy korábban leírt, FSSC-specifikus PCR-alapú azonosítási módszerrel: az általunk kidolgozott módszer az esetek 100%-ában, a PCR-alapú módszer az esetek 93,75%-ában adott helyes eredményt.

## **3. Klinikai *Fusarium* izolátumok antifungális szerekkel szembeni érzékenységének vizsgálata.**

Munkánk során *in vitro* mikrodilúciós módszerrel vizsgáltuk a klinikumban terápiás céllal leggyakrabban alkalmazott azol-, polién- és allilamin-típusú antimikotikumok (AMB, ECN, ITC, CLT, NTM, TRB és VRC) hatékonyságát klinikai *Fusarium* izolátumokkal szemben. A legalacsonyabb MIC-értékeket az AMB, NTM és TRB esetében figyeltük meg, habár voltak olyan izolátumok, amelyek egyik szerrel szemben sem bizonyultak érzékenyek a vizsgált koncentráció-tartományon belül. A NTM az izolátumok többségének növekedését a szemben terápiásan elérhető koncentrációban gátolta. Az ECN, CLT és VRC esetében, néhány kivételtől eltekintve, igen magas MIC-értékeket tapasztaltunk, az ITC pedig csak egy izolátum esetében okozott teljes gátlást a vizsgált koncentráció-tartományon belül. A fajkomplexumok között nem tapasztaltunk jelentős érzékenységbeli eltéréseket.

#### **4. Illóolajok *Fusarium*-okkal szembeni gátló hatásának vizsgálata.**

Vizsgálataink során elsőként 9 illóolaj (borókaolaj, citromolaj, citromos eukaliptuszolaj, fahéjolaj, kakukkfűolaj, kúszó fajdbogyóolaj, majorannaolaj, muskotályzsályaolaj, teafaolaj) antifungális hatását vizsgáltuk *in vitro* mikrodilúciós teszttel. A tesztelt illóolajok különböző hatékonysággal gátolták a klinikai *Fusarium* izolátumok növekedését *in vitro*. A legjelentősebb gátló hatást a fahéjolaj esetében tapasztaltuk. Fő komponense, a fahéjaldehid szintén erős antifungális hatással rendelkezett.

Ezt követően a fahéjolaj és a fahéjaldehid antifungális hatásának manifesztációját fény- és fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Eredményeink alapján a fahéjolaj és a fahéjaldehid szignifikánsan csökkentette a vizsgált izolátum metabolikus aktivitását, életképességét és gátolta a konídiumok csírázását.

#### **5. Klinikai *Fusarium* izolátumok antifungális hatású anyagok kombinációival szembeni érzékenységeinek vizsgálata.**

42 klinikai *Fusarium* izolátummal szemben vizsgáltuk az *in vitro* mikrodilúciós tesztekben leghatásosabbnak bizonyuló, de eltérő hatásmechanizmusú két antifungális szer, a NTM és TRB között fellépő lehetséges kölcsönhatásokat. A két szer együttes alkalmazásával elért antifungális hatás hasonló mértékű vagy erősebb volt a NTM vagy a TRB önállóan elért gátló hatásához képest. 31 esetben (71,8%) tapasztaltunk szinergizmust, 11 esetben (28,2%) pedig indifferens kölcsönhatást a két szer között. Antagonizmust egy esetben sem figyeltünk meg.

Emellett *in vitro* kombinációs tesztekben vizsgáltuk a NTM, valamint a vizsgálataink során legerősebb antifungális hatást mutató illóolaj fő komponense, a fahéjaldehid között fellépő kölcsönhatásokat. Kísérleteink során a két hatóanyag között főleg indifferens kölcsönhatást tapasztaltunk. Mindössze egy esetben figyeltünk meg szinergizmust. Ennek ellenére fontos megjegyezni, hogy a magas NTM MIC-értékek fahéjaldehid jelenlétében a szemben elérhető terápiás NTM koncentráció-tartományra csökkentek.

#### **6. Klinikai és környezeti FSSC izolátumok extracelluláris enzimaktivitásainak összehasonlítása.**

Az extracelluláris enzimaktivitási tesztek a *Fusarium* fertőzésekből leggyakrabban izolálható fajkomplexum képviselőin, FSSC izolátumokon végeztük el. Összesen 67 (23 indiai klinikai, 19 indiai talaj-, 11 indiai növényi és 14 különböző földrajzi régióból származó növényi) izolátum extracelluláris celluláz, elasztáz, foszfolipáz, kazeináz, keratináz, lipáz és pektináz aktivitását teszteltük és hasonlítottuk össze. Eredményeink alapján keratitiszből

származó *Fusarium*-ok szignifikánsan magasabb proteáz (kazeináz és keratináz) aktivitással rendelkeztek, mint a növényi izolátumok. Ezzel szemben a növényi mintából származó izolátumok a klinikai és talajizolátumokhoz képest kiemelkedően magas lipáz aktivitással rendelkeztek. A különböző forrásból származó izolátumok celluláz, elasztáz és pektináz aktivitásában nem figyeltünk meg szignifikáns eltéréseket. Lehetségesnek tartjuk, hogy nem egy kitüntetett enzim, hanem több extracelluláris enzim, illetve egyéb virulencia faktorok együttese szükséges egy sikeres humán fertőzés kialakításához.

**Munkánk során megállapítottuk, hogy habár az FSSC képviselői továbbra is a szaruhártya-gyulladás legfőbb kórokozói közé tartoznak Dél-Indiában, más fajkomplexumok és fajok (pl. *F. napiforme*) is egyre gyakrabban hozhatóak összefüggésbe a megbetegedéssel. Kidolgoztunk egy FSSC-specifikus új, gyors, molekuláris azonosítási módszert, amely jelentősen meggyorsíthatja az azonosítás folyamatát és lerövidítheti az FSSC-specifikus terápia megkezdéséig eltelt időt. Emellett eredményeink hozzájárulhatnak egy a *Fusarium* keratitisz kezelésére alkalmas új, hatékony, biztonságosan alkalmazható, egyszerű vagy kombinált terápia kifejlesztéséhez.**



## 8. SUMMARY

The genus *Fusarium* is a large group of hyaline filamentous fungi. They are widely distributed in soil as harmless, saprophytic organisms. However, some members of this genus are capable of causing infection in plants, animals and humans. According to the latest surveys, *Fusarium* species are the most frequently isolated causative agents of fungal keratitis in South India. The members of the genus and especially the *Fusarium solani* species complex (FSSC) usually show poor susceptibility to clinically applied antifungal drugs, and the antifungal susceptibilities of different *Fusarium* species complexes vary. Thus, the management of *Fusarium* keratitis is still challenging. The misidentification of the causative agent and the subsequent application of an inappropriate antifungal therapy may even result in the loss of vision. Using molecular techniques in laboratory practice instead of conventional morphological methods can make the identification process faster and more accurate. New antifungals and alternative treatments would also be necessary to treat *Fusarium* infections.

The objectives of the present study were:

- to identify *Fusarium* isolates derived from human keratitis using molecular methods and to investigate their phylogenetic relationships,
- to find a new, rapid and reliable identification method for the FSSC, the taxon most commonly isolated from *Fusarium* keratitis cases,
- to determine the *in vitro* susceptibilities of clinical *Fusarium* isolates to commonly used antifungal agents,
- to study the *in vitro* inhibitory effects of essential oils on *Fusarium* species complexes isolated from human keratitis,
- to investigate the *in vitro* interactions between antifungal drugs as well as between antifungals and essential oil components,
- to examine and compare the extracellular enzyme activities of clinical and environmental FSSC isolates.

Our main results were the following:

### **1. Molecular identification and phylogenetic analysis of *Fusarium* isolates derived from human keratitis.**

A total of 70 *Fusarium* isolates derived from human keratomycosis were identified based on the BLAST searches of the partial sequences of translation elongation factor 1 $\alpha$  (*TEF1*) and  $\beta$ -tubulin (*TUB*) genes. The results of BLAST searches were confirmed by

phylogenetic analysis using the same two sequences. These analyses generated a tree which can be separated into five well supported clades: Clade 1 included all the members of the FSSC, Clade 2 the *Fusarium dimerum* species complex (FDSC), Clade 3 the *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC), Clade 4 the *Fusarium oxysporum* species complex (FOSC), and Clade 5 all the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex (FIESC) isolates. Our phylogenetic analysis revealed that one isolate identified previously as the member of FOSC using BLAST search belongs to the FFSC clade in fact. Thus the final results of the identification process were the following: 53 isolates confirmed as members of the FSSC, six-six isolates belonged to the FDSC and FFSC, three isolates to the FOSC and two to the FIESC. At species level six isolates were identified as *Fusarium delphinoides* (FDSC) and three as *Fusarium napiforme* (FFSC). To our knowledge, this is the first report in the world of *F. napiforme* as the causative agent of human keratomycosis.

## **2. A new, rapid and reliable identification method for the FSSC.**

A new, rapid method for the identification of FSSC was developed based on our *in silico* observations that the recognition site of *EcoRI* restriction endonuclease is found only in the partial *TEF1* sequences of FSSC strains. To prove this experimentally, the partial *TEF1* of 80 *Fusarium* isolates was digested by *EcoRI*, which resulted in the two expected fragments in case of all the FSSC isolates. False negative or false positive results were not observed. We also compared the specificity of our method with a previously described FSSC-specific PCR method: our method identified 100%, while the FSSC-specific PCR identified only the 93.75% of the examined isolates correctly.

## **3. *In vitro* susceptibilities of clinical *Fusarium* isolates to commonly used antifungal agents.**

*In vitro* antifungal susceptibilities of clinical isolates to seven commonly used antifungals (amphotericin B, AMB; clotrimazole, CLT; econazole, ECN; itraconazole, ITC; natamycin, NTM; terbinafine, TRB; and voriconazole, VRC) were determined by the broth microdilution method. TRB, NTM and AMB were the most effective antifungal drugs against the majority of the investigated isolates. Seventy percent of the isolates were inhibited by NTM in a concentration range which can be achieved in the eye during therapeutic conditions. The largest part of each species complex showed high MIC values to CLT, ECN and VRC in the examined concentration range. With one exception (an FSSC strain) ITC proved to be ineffective against the investigated isolates. Similar results were found in the tests with ITC. No specific clades with differing antifungal susceptibility could be observed.

#### **4. *In vitro* inhibitory effects of essential oils on *Fusarium* species complexes isolated from human keratitis.**

To reveal the potential of essential oils as monotherapeutic agents against clinical *Fusarium* isolates, the minimal inhibitory concentration (MIC) values of nine essential oils (cinnamon, juniper, lemon eucalyptus, lime, marjoram, sage, teatree, thyme, wintergreen) were determined using broth microdilution tests. The tested essential oils exhibited different anti-*Fusarium* activities. Cinnamon oil proved to be the most effective essential oil against all investigated *Fusarium* isolates. The main component of cinnamon oil, trans-cinnamaldehyde was also involved in these tests: it showed a similarly strong antifungal activity. The other essential oils exerted relatively lower antifungal activities. Lime oil proved to be the least effective against the investigated *Fusarium* isolates. The antifungal effect of the tested essential oils varied in a species complex-independent manner.

We also investigated the germination ability, metabolic activity and viability of *Fusarium* conidia in the presence of cinnamon oil and its main component trans-cinnamaldehyde using light and fluorescent microscopic techniques. Based on our observations, cinnamon oil and trans-cinnamaldehyde significantly decreased the metabolic activity, viability and inhibited the germination of *Fusarium* conidia.

#### **5. *In vitro* interactions between antifungal drugs as well as between antifungals and essential oil components.**

Because their high *in vitro* efficacy and their differing modes of action, drug interactions were investigated between NTM and TRB in the case of 42 isolates using the checkerboard microdilution method. The combined application of these two drugs displayed either synergistic interactions (in 71.8% of the strains) or the two compounds did not interact with each other (28.2%). In the case of the examined members of FOCS and FIESC, only synergistic interactions were observed between NTM and TRB. Antagonistic interactions were not revealed between the two compounds.

The *in vitro* combinations of NTM and trans-cinnamaldehyde - the main component of the most effective essential oil (cinnamon oil) - were also tested. In most of the cases, interactions were not observed between NTM and trans-cinnamaldehyde. Synergistic interaction was revealed between the two compounds in one case only. Antagonism was not detected at all. Although the low level of synergism, we observed an enhanced fungal growth inhibition when these agents were applied in combination.

## **6. Extracellular enzyme activities of clinical and environmental FSSC isolates.**

The extracellular casease, cellulase, elastase, keratinase, lipase, phospholipase and pectinase activities of 67 FSSC isolates (23 clinical isolates from India, 19 soil isolates from India, 11 plant isolates from India, and 14 plant isolates from different geographical regions of the world) were investigated. We observed a significantly higher keratinase and casease activity in the case of the clinical isolates compared to the plant isolates, while plant isolates showed significantly higher lipase activity than clinical and soil isolates.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

- Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Mellado E, Juan Luís Rodríguez-Tudela JL** (2008) Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. *J Antimicrob Chemother.* 61 (4): 805-809.
- Alexandrakis G, Jalali S, Gloor P** (1998) Diagnosis of *Fusarium* keratitis in an animal model using the polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol.* 82 (3): 306-311.
- Al-Hatmi AMS, Meis JF, de Hoog GS** (2016a) *Fusarium*: molecular diversity and intrinsic drug resistance. *PLoS Pathog.* 12 (4): e1005464.
- Al-Hatmi AMS, Meletiadis J, Curfs-Breuker I, Bonifaz A, Meis JF, De Hoog GS** (2016b) *In vitro* combinations of natamycin with voriconazole, itraconazole and micafungin against clinical *Fusarium* strains causing keratitis. *J Antimicrob Chemother.* 71 (4): 953-955.
- Al-Hatmi AMS, van Diepeningen AD, Curfs-Breuker I, de Hoog GS, Meis JF** (2015a) Specific antifungal susceptibility profiles of opportunists in the *Fusarium fujikuroi* complex. *J Antimicrob Chemother.* 70 (4): 1068-1071.
- Al-Hatmi AMS, Mirabolfathy M, Hagen F és mtsai.** (2015b) DNA barcoding, MALDI-TOF and AFLP data support *Fusarium ficicrescens* as a distinct species within the *F. fujikuroi* species complex. *Fungal Biol.* 120 (2): 265-278.
- Altun A, Kurna SA, Sengor T és mtsai.** (2014) Effectiveness of posaconazole in recalcitrant fungal keratitis resistant to conventional antifungal drugs. *Case Rep Ophthalmol Med.* 2014: 701653.
- Ananthi S, Venkatesh Prajna N, Lalitha P, Valarnila M, Dharmalingam K** (2013) Pathogen induced changes in the protein profile of human tears from *Fusarium* keratitis patients. *PLoS ONE.* 8 (1): e53018.
- Aruljyothi L, Radhakrishnan N, Prajna VN, Lalitha P** (2016) Clinical and microbiological study of paediatric infectious keratitis in South India: a 3-year study (2011–2013). *Br J Ophthalmol.* doi:10.1136/bjophthalmol-2015-307631.
- Azor M, Gené J, Cano J, Guarro J** (2007) Universal *in vitro* antifungal resistance of genetic clades of the *Fusarium solani* species complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 51 (4): 1500-1503.
- Azor M, Gené J, Cano J, Manikandan P, Venkatapathy N, Guarro J** (2009) Less-frequent *Fusarium* species of clinical interest: correlation between morphological and

- molecular identification and antifungal susceptibility. *J Clin Microbiol.* 47 (5): 1463-1468.
- Babalola OO** (2010) Pectinolytic and cellulolytic enzymes enhance *Fusarium compactum* virulence on tubercles infection of egyptian broomrape. *Int J Microbiol.* 2010: Article ID 273264.
- Bang K, Lee DW, Park HM, Rhee YH** (2000) Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by trans-cinnamaldehyde. *Biosci Biotechnol Biochem.* 64 (5): 1061-1063.
- Barrera-Necha LL, Garduno-Pizana C, Garcia-Barrera LJ** (2009) *In vitro* antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Massey) Snyder and Hansen. *Plant Pathol J.* 8 (1): 17-21.
- Bharathi MJ, Ramakrishnan R, Meenakshi R, Padmavathy S, Shivakumar C, Srinivasan M** (2007) Microbial keratitis in South India: influence of risk factors, climate, and geographical variation. *Ophthalmic Epidemiol.* 14 (2): 61-69.
- Bharathi MJ, Ramakrishnan R, Vasu S, Meenakshi R, Palaniappan R** (2003) Epidemiological characteristics and laboratory diagnosis of fungal keratitis. A three-year study. *Indian J Ophthalmol.* 51 (4): 315-321.
- Bilai VI** (1955) The fusaria (biology and systematics). Akademia Naukwe Ukrainskii, Kiev, USSR.
- Blanco JL, Hontecillas R, Bouza E és mtsai.** (2002) Correlation between the elastase activity index and invasiveness of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol.* 40 (5): 1811-1813.
- Booth C** (1971) The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycology Institute, Kew, Surrey.
- Bullock JD, Warwar RE, Elder BL, Northern WI** (2008) Temperature instability of ReNu with MoistureLoc: a new theory to explain the worldwide *Fusarium* keratitis epidemic of 2004-2006. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 106: 117-127.
- Carmo ES, de Oliveira Lima E, Souza EL, de Sousa FB** (2008) Effect of *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil on the growth and morphogenesis of some potentially pathogenic *Aspergillus* species. *Braz J Microbiol.* 39 (1): 91-97.
- Casadevall A** (2006) Cards of virulence and the global virulome for humans. *Microbe.* 1 (8): 359-364.
- Cavaleiro C, Pinto E, Gonçalves MJ, Salgueiro L** (2006) Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. *J Appl Microbiol.* 100 (6): 1333-1338.

- Chakrabarti A, Singh R** (2011) The emerging epidemiology of mould infections in developing countries. *Curr Opin Infect Dis.* 24 (6): 521-526.
- Chander J, Singla N, Agnihotri N, Arya SK, Deep A** (2008) Keratomycosis in and around Chandigarh: A five-year study from a north Indian tertiary care hospital. *Indian J Pathol Microbiol.* 51 (2): 304-306.
- Chuah TS, Tan YY, Ismail BS** (2010) *In vitro* evaluation of the antifungal activity of some essential oils on postharvest fungal pathogens of tropical fruits. *Plant Prot Q.* 25 (4): 162-164.
- Chung WH, Ishii H, Nishimura K, Ohshima M, Iwama T, Yoshimatsu H** (2008) Genetic analysis and PCR-based identification of major *Fusarium* species causing head blight on wheat in Japan. *J Gen Plant Pathol.* 74 (5): 364-374.
- Ciolino JB, Hudson SP, Mobbs AN és mtsai.** (2011) A prototype antifungal contact lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52 (9): 6286-6291.
- Clinical and Laboratory Standards Institute** (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. In: Approved standard CLSI document M38-A2. CLSI, Wayne.
- Coleman JJ, Rounsley SD, Rodriguez-Carres M és mtsai.** (2009) The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. *PLoS Genet.* 5 (8): e1000618.
- Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA és mtsai.** (2012) The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol.* 13 (4): 414-430.
- De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C és mtsai.** (2012) Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 18 (5): 475-484.
- de Lira Mota KS, de Oliveira Pereira F, de Oliveira WA, Lima IO, de Oliveira Lima E** (2012) Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: interaction with ergosterol. *Molecules.* 17 (2): 14418-14433.
- Deorukhkar S, Katiyar R, Saini S** (2012) Epidemiological features and laboratory results of bacterial and fungal keratitis: a five-year study at a rural tertiary-care hospital in western Maharashtra, India. *Singapore Med J.* 53 (4): 264-267.
- Dóczi I, Gyetvai T, Kredics L, Nagy E** (2004) Involvement of *Fusarium* spp. in fungal keratitis. *Clin Microbiol Infect.* 10 (9): 773-776.

- Dong XH, Gao WJ, He XP** (2012) Antifungal efficacy of natamycin in experimental *Fusarium solani* keratitis. *Int J Ophthalmol.* 5 (2): 143-146.
- Dzamic A, Sokovic M, Ristic M, Grujic-Jovanic S, Vukojevic J, Marin PD** (2007) Chemical composition and antifungal activity of *Salvia sclarea* (Lamiaceae) essential oil. *Arch Biol Sci.* 60 (2): 233-237.
- Eliopoulos GM, Moellering RC** (1996) Antimicrobial combinations. In: Lorian V (szerk.) *Antibiotics in Laboratory Medicine.* The Williams and Wilkins Co., 4th ed. Baltimore, Md. 330-396.
- El-Zemity SR, Ahmad SM** (2005) Antifungal activity of some essential oils and their major chemical constituents against some phytopathogenic fungi. *J Pest Cont & Environ Sci.* 13 (1): 61-72.
- Epstein AB** (2007) In the aftermath of the *Fusarium* keratitis outbreak: What have we learned? *Clin Ophthalmol.* 1 (4): 355-366.
- Espinel-Ingroff A, Colombo AL, Cordoba S és mtsai.** (2015) International evaluation of MIC distributions and epidemiological cutoff value (ECV) definitions for *Fusarium* species identified by molecular methods for the CLSI broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother.* 60 (2): 1079-1084.
- Faria CB, Abe CA, da Silva CN, Tessmann DJ, Barbosa-Tessmann IP** (2012) New PCR assays for the identification of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, and other species of the *Gibberella fujikuroi* complex. *Int J Mol Sci.* 13 (1): 115-132.
- Flores FC, de Lima JA, Ribeiro RF és mtsai.** (2013) Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia.* 175 (3-4): 281-286.
- Fraternale D, Giamperi L, Bucchini A és mtsai.** (2005) Composition and antifungal activity of essential oil of *Salvia sclarea* from Italy. *Chem Nat Compd.* 41 (5): 604-606.
- Freire JM, Cardoso MG, Batista LR, Andrade MA** (2011) Essential oil of *Origanum majorana* L., *Illicium verum* Hook. f. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume: chemical and antimicrobial characterization. *Rev Bras Pl Med.* 13 (2): 209-214.
- Garnica M, Nucci M** (2013) Epidemiology of fusariosis. *Curr Fungal Infect Rep.* 7 (4): 301-305.
- Geiser DM, Aoki T, Bacon CW és mtsai.** (2013) One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. *Phytopathology.* 103 (5): 400-408.



- Geiser DM, Jiménez-Gasco M, Kang S és mtsai.** (2004) FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. Eur J Plant Pathol. 110 (5): 473-479.
- Gerlach W, Nirenberg H** (1982) The genus *Fusarium* - a pictorial atlas. Mitt Biol Bundesanst Land Forstwirtsch Berl Dahlem. 209: 1-406.
- Ghannoum MA** (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev. 13 (1): 122-143.
- Gopal N, Randhir Babu Singh Y, Panneer Selvam K, Manikandan P, Shobana CS** (2013) Extracellular enzyme activity indices of *Fusarium* species isolated from mycotic keratitis. Int J Biol Pharm Res. 4 (12): 1070-1075.
- Gopinathan U, Ramakrishna T, Willcox M és mtsai.** (2001) Enzymatic, clinical and histologic evaluation of corneal tissues in experimental fungal keratitis in rabbits. Exp Eye Res. 72 (4): 433-442.
- Gordon WL** (1952) The occurrence of *Fusarium* species in Canada: II. prevalence and taxonomy of *Fusarium* species in cereal seed. Can J Bot. 30 (2): 209-251.
- Gömöri Cs, Nacsá-Farkas E, Kerekes EB, Kocsubé S, Vágvölgyi Cs, Krisch J** (2013) Evaluation of five essential oils for the control of food-spoilage and mycotoxin producing fungi. Acta Biol Szeged. 57 (2): 113-116.
- Graff JM, Goins KM, Sutphin JE** (2006) Fungal keratitis - *Fusarium*: 41-year-old female contact lens wearer with persisting keratitis. EyeRounds.org. Letöltve: 2016. <http://www.EyeRounds.org/cases/59-fusarium-fungal-keratitis-ReNu-MoistureLoc.htm>.
- Guarro J** (2013) Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 32 (12): 1491-1500.
- Guarro J, Rubio C, Gené J és mtsai.** (2003) Case of keratitis caused by an uncommon *Fusarium* species. J Clin Microbiol. 41 (12): 5823-5826.
- Guevara-Suarez M, Cano-Lira JF, Cepero de García MC és mtsai.** (2016) Genotyping of *Fusarium* isolates from onychomycoses in Colombia: detection of two new species within the *Fusarium solani* species complex and *in vitro* antifungal susceptibility testing. Mycopathologia. 181 (3-4): 165-174.
- Guindon S Gascuel O** (2003) A simple fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol. 52 (5): 696-704.
- Gupta N, Tandon R, Gupta SK, Sreenivas V, Vashist P** (2013) Burden of corneal blindness in India. Indian J Community Med. 38 (4): 198-206.
- Hall TA** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser. 41: 95-98.

- Hassan AS, Al-Hatmi AM, Shobana CS és mtsai.** (2016) Antifungal susceptibility and phylogeny of opportunistic members of the genus *Fusarium* causing human keratomycosis in South India. *Med Mycol.* 54 (3): 287-294.
- Hawksworth DL, Crous PW, Redhead SA és mtsai.** (2011) The Amsterdam Declaration on fungal nomenclature. *IMA Fungus.* 2 (1): 105-112.
- Hawksworth DL** (2011) A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA Fungus.* 2 (2): 155-162.
- He D, Hao J, Zhang B és mtsai.** (2011) Pathogenic spectrum of fungal keratitis and specific identification of *Fusarium solani*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52 (5): 2804-2808.
- Huang CH, Roberts PD, Datnoff LE** (2011) Silicon suppresses *Fusarium* crown and root rot of tomato. *J Phytopathology.* 159 (7-8): 546-554.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F** (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenies. *Bioinformatics.* 17 (8): 754-755.
- Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL** (2012) Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol.* 3: 12.
- Iqbal NJ, Boey A, Park BJ, Brandt ME** (2008) Determination of *in vitro* susceptibility of ocular *Fusarium* spp. isolates from keratitis cases and comparison of Clinical and Laboratory Standards Institute M38-A2 and E test methods. *Diagn Micr Infec Dis.* 62 (3): 348-350.
- Jain A, Shah SG, Chugh A** (2015) Cell penetrating peptides as efficient nanocarriers for delivery of antifungal compound, natamycin for the treatment of fungal keratitis. *Pharm Res.* 32 (6): 1920-1930.
- Javed S, Shoaib A, Mahmood Z, Mushtaq S, Iftikhar S** (2012) Analysis of phytochemical constituents of *Eucalyptus citriodora* L. responsible for antifungal activity against post-harvest fungi. *Nat Prod Res.* 26 (18): 1732-1736.
- Jeschke N, Nelson PE, Marasas WFO** (1990) *Fusarium* species isolated from soil samples collected at different altitudes in the Transkei, Southern Africa. *Mycologia.* 82 (6): 727-733.
- Joffe AZ** (1974) A modern system of *Fusarium* taxonomy. *Mycopathol Mycol Appl.* 53 (1): 201-228.
- Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH** (2004) Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 48 (3): 693-715.

- Khan MS, Ahmad I** (2011) *In vitro* antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of *Cinnamomum*-, *Syzygium*- and *Cymbopogon*-species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Phytomedicine*. 19 (1): 48-55.
- Kikot GE, Hours RA, Alconada TM** (2009) Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. *J Basic Microbiol*. 49 (3): 231-241.
- Kim JH, Chan K, Mahoney N, Campbell BC** (2011) Antifungal activity of redox-active benzaldehydes that target cellular antioxidation. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 10: 23.
- Kiryu H, Yoshida S, Suenaga Y, Asahi M** (1991) Invasion and survival of *Fusarium solani* in the dexamethasone-treated cornea of rabbits. *J Med Vet Mycol*. 29 (6): 395-406.
- Krizsán K** (2012) Opportunista patogén *Cochliobolus* izolátumok jellemzése. Doktori értekezés. Mikrobiológiai Tanszék, Szegedi Tudományegyetem.
- Lalitha P, Prajna NV, Kabra A, Mahadevan K, Srinivasan M** (2006) Risk factors for treatment outcome in fungal keratitis. *Ophthalmology*. 113 (4): 526-530.
- Lalitha P, Shapiro BL, Srinivasan M és mtsai.** (2007) Antimicrobial susceptibility of *Fusarium*, *Aspergillus*, and other filamentous fungi isolated from keratitis. *Arch Ophthalmol*. 125: 789-793.
- Lalitha P, Vijaykumar R, Prajna NV, Fothergill AW** (2008a) *In vitro* natamycin susceptibility of ocular isolates of *Fusarium* and *Aspergillus* species: comparison of commercially formulated natamycin eye drops to pharmaceutical-grade powder. *J Clin Microbiol*. 46 (10): 3477-3478.
- Lalitha P, Vijaykumar, Prajna NV, Srinivasan M** (2008b) Aravind's atlas of fungal corneal ulcers - Clinical features and laboratory identification methods. New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP és mtsai.** (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23 (21): 2947-2948.
- Lau D, Fedinands M, Leung L és mtsai.** (2008) Penetration of voriconazole, 1%, eyedrops into human aqueous humor: a prospective open-label study. *Arch Ophthalmol*. 126 (3): 343-346.
- Lee SK, Kim SS, Nahm DH és mtsai.** (2000) Hypersensitivity pneumonitis caused by *Fusarium napiforme* in a home environment. *Allergy*. 55 (12): 1190-1193.
- Lee SO, Choi GJ, Jang KS, Lim HK, Cho KY, Kim JC** (2007) Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. *Plant Pathol J*. 23 (2): 97-102.

- Leeja L, Thoppil JE** (2007) Antimicrobial activity of methanol extract of *Origanum majorana* L. (Sweet marjoram). *J Environ Biol.* 28 (1): 145-146.
- Leslie JF, Summerell BA** (2006) The *Fusarium* laboratory manual. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Li L, Wang Z, Li R, Luo S, Sun X** (2008) *In vitro* evaluation of combination antifungal activity against *Fusarium* species isolated from ocular tissues of keratomycosis patients. *Am J Ophthalmol.* 146 (5): 724-728.
- Liang QF, Jin XY, Wang XL, Sun XG** (2009) Effect of topical application of terbinafine on fungal keratitis. *Chin Med J.* 122 (16): 1884-1888.
- Link HF** (1809) Observationes in ordines plantarum naturales. Dissertatio I. Mag Ges Naturf Freunde Berlin. 3 (1): 3-42.
- Loh AR, Hong K, Lee S, Mannis M, Acharya NR** (2009) Practice patterns in the management of fungal corneal ulcers. *Cornea.* 28 (8): 856-859.
- Lombard L, van der Merwe NA, Groenewald JZ, Crous PW** (2015) Generic concepts in Nectriaceae. *Stud Mycol.* 80: 189-245.
- Ma LJ, Geiser DM, Proctor RH és mtsai.** (2013) *Fusarium* pathogenomics. *Annu Rev Microbiol.* 67: 399-416.
- Ma LJ, van der Does HC, Borkovich KA és mtsai.** (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature.* 464 (7287): 367-373.
- Magnoli CE, Saenz MA, Chiacchiera SM, Dalcero AM** (1999) Natural occurrence of *Fusarium* species and fumonisin-production by toxigenic strains isolated from poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia.* 145 (1): 35-41.
- Manikandan P, Galgóczy L, Panneer Selvam K és mtsai.** (2011) Chapter 51. *Fusarium*. In: Liu D (szerk.) *Molecular Detection of Human Fungal Pathogens*. London: Taylor & Francis Group. 409-425.
- Marasas WFO, Rabie CJ, Lübben A** (1987) *Fusarium napiforme*, a new species from millet and sorghum in Southern Africa. *Mycologia.* 76 (6): 910-914.
- Marinach-Patrice C, Lethuillier A, Marly A és mtsai.** (2009) Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clin Microbiol Infect.* 15 (7): 634-642.
- Matuo T** (1972) Taxonomic studies of phytopathogenic fungi in Japan. *Rev Plant Prot Res.* 5: 34-45.
- Mayayo E, Pujol I, Guarro J** (1999) Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model. *J Med Microbiol.* 48 (4): 363-366.

- Melcher GP, McGough DA, Fothergill AW, Norris C, Rinaldi MG** (1993) Disseminated hyalohyphomycosis caused by a novel human pathogen, *Fusarium napiforme*. *J Clin Microbiol.* 31 (6): 1461-1467.
- Messiaen CM, Cassini R** (1968) Recherches sur les fusarioses. IV. La systematique des *Fusarium*. *Ann Epiphyt.* 19 (3): 387-454.
- Mikami R, Stemmermann GN** (1958) Keratomycosis caused by *Fusarium oxysporum*. *Am J Clin Pathol.* 29 (3): 257-262.
- Minervini F, Dell'Aquila ME** (2008) Zearalenone and reproductive function in farm animals. *Int J Mol Sci.* 9 (12): 2570-2584.
- Mishra AK, Mishra A, Kehri HK, Sharma B, Pandey AK** (2009) Inhibitory activity of Indian spice plant *Cinnamomum zeylanicum* extracts against *Alternaria solani* and *Curvuluria lunata*, the pathogenic dematiaceous moulds. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 8: 9.
- Morand K, Bartoletti AC, Bochot A, Barratt G, Brandely ML, Chast F** (2007) Liposomal amphotericin B eye drops to treat fungal keratitis: physico-chemical and formulation stability. *Int J Pharm.* 344 (1-2): 150-153.
- Moretti AN** (2009) Taxonomy of *Fusarium* genus: A continuous fight between lumpers and splitters. *Proc Nat Sci Matica Sprska.* 117: 7-13.
- Mstelle J** (2001) Use of topical clotrimazole in human keratomycosis. *Ophthalmologica.* 215 (5): 357-360.
- Mukherjee PK, Chandra J, Yu C, Sun Y, Pearlman E, Ghannoum MA** (2012) Characterization of *Fusarium* keratitis outbreak isolates: contribution of biofilms to antimicrobial resistance and pathogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 53 (8): 4450-4457.
- Muraosa Y, Schreiber AZ, Trabasso P és mtsai.** (2014) Development of cycling probe-based real-time PCR system to detect *Fusarium* species and *Fusarium solani* species complex (FSSC). *Int J Med Microbiol.* 304 (3-4): 505-511.
- Mythili A, Randhir Babu Singh Y, Priya R és mtsai.** (2014) *In vitro* and comparative study on the extracellular enzyme activity of molds isolated from keratomycosis and soil. *Int J Ophthalmol.* 7 (5): 778-784.
- Naiker S, Odhav B** (2004) Mycotic keratitis: profile of *Fusarium* species and their mycotoxins. *Mycoses.* 47 (1-2): 50-56.

- Nayak N, Satpathy G, Prasad S, Vajpayee RB, Pandey RM** (2010) Correlation of proteinase production with amphotericin B resistance in fungi from mycotic keratitis. *Ophthalmic Res.* 44 (2): 113-118.
- Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ** (1994) Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev.* 7 (4): 479-504.
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO** (1983) *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. State University Press, University Park, Pennsylvania, USA.
- Nikolić M, Marković T, Mojović M és mtsai.** (2013) Chemical composition and biological activity of *Gaultheria procumbens* L. essential oil. *Ind Crop Prod.* 49: 561-567.
- Nirenberg HI, O'Donnell K** (1998) New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia.* 90 (3): 434-458.
- Odds FC** (2003) Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* 52 (1): 1.
- O'Donnell K, Gueidan C, Sink S és mtsai.** (2009a) A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genet Biol.* 46 (12): 936-948.
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC** (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95 (5): 2044-2049.
- O'Donnell K, Rooney AP, Proctor RH és mtsai.** (2013) Phylogenetic analyses of *RPB1* and *RPB2* support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genet Biol.* 52: 20-31.
- O'Donnell K, Sarver BAJ, Brandt M és mtsai.** (2007) Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic *Fusaria*, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *J Clin Microbiol.* 45 (7): 2235-2248.
- O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A és mtsai.** (2008) Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and *in vitro* antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *J Clin Microbiol.* 46 (8): 2477-2490.
- O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Gueidan C, Crous PW, Geiser DM** (2009b) Novel Multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum-F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. *J Clin Microbiol.* 47 (12): 3851-3861.

- O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG és mtsai.** (2010) Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *J Clin Microbiol.* 48 (10): 3708-3718.
- O'Donnell K, Ward TJ, Robert VARG, Crous PW, Geiser DM, Kang S** (2015) DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. *Phytoparasitica.* 43 (5): 583-595.
- Ooi LSM, Li Y, Kam SL, Wang H, Wong EYL, Ooi VEC** (2006) Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. *Am J Chin Med.* 34 (3): 511-522.
- Panneer Selvam K, Randhir Babu Singh Y, Shobana CS és mtsai.** (2014) Extracellular enzymes and mycotoxins as virulence factors in *Fusarium* and *Aspergillus* keratitis. *Biosci Biotechnol Res Asia.* 11 (2): 479-490.
- Pepeljnjak S, Kosalec I, Kalodera Z, Blazević N** (2005) Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L., Cupressaceae). *Acta Pharm.* 55 (4): 417-422.
- Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L és mtsai.** (2006) Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Med Microbiol.* 55 (Pt 10): 1367-1373.
- Pisseri F, Bertoli A, Nardoni S és mtsai.** (2009) Antifungal activity of tea tree oil from *Melaleuca alternifolia* against *Trichophyton equinum*: an *in vivo* assay. *Phytomedicine.* 16 (11): 1056-1058.
- Posada D, Crandall KA** (1998) MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 14 (9): 817-818.
- Pradhan L, Sharma S, Nalamada S, Sahu SK, Das S, Garg P** (2011) Natamycin in the treatment of keratomycosis: correlation of treatment outcome and *in vitro* susceptibility of fungal isolates. *Indian J Ophthalmol.* 59 (6): 512-514.
- Prajna NV, John RK, Nirmalan PK, Lalitha P, Srinivasan M** (2003) A randomised clinical trial comparing 2% econazole and 5% natamycin for the treatment of fungal keratitis. *Br J Ophthalmol.* 87 (10): 1235-1237.
- Prajna NV, Krishnan T, Mascarenhas J és mtsai.** (2012) Predictors of outcome in fungal keratitis. *Eye.* 26 (9): 1226-1231.
- Prajna NV, Krishnan T, Mascarenhas J és mtsai.** (2013) The mycotic ulcer treatment trial: a randomized trial comparing natamycin vs voriconazole. *JAMA Ophthalmol.* 131 (4): 422-429.

- Prajna NV, Mascarenhas J, Krishnan T és mtsai.** (2010) Comparison of natamycin and voriconazole for the treatment of fungal keratitis. *Arch Ophthalmol.* 128 (6): 672-678.
- Raillo A** (1950) Fungi of the genus *Fusarium*. State Publ Agr Litr. Moscow, USSR.
- Rambaut A, Drummond AJ** (2007) MCMC Trace Analysis Tool Version v1.4. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Ramezani H, Singh HP, Batish DR, Kohli RK** (2002) Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora*. *Fitoterapia.* 73 (1): 261-262.
- Ranasinghe L, Jayawardena B, Abeywickrama K** (2002) Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M. Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. *Lett Appl Microbiol.* 35 (3): 208-211.
- Rao A, Zhang Y, Muend S, Rao R** (2010) Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrob Agents Chemoter.* 54 (12): 5062-5069.
- Rautaraya B, Sharma S, Kar S, Das S, Sahu SK** (2011) Diagnosis and treatment outcome of mycotic keratitis at a tertiary eye care center in eastern India. *BMC Ophthalmol.* 11: 39.
- Sangalang AE, Burgess LW, Backhouse D, Duff J, Wurst M** (1995) Mycogeography of *Fusarium* species in soils from tropical, arid and Mediterranean regions of Australia. *Mycol Res.* 99 (5): 523-528.
- Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG** (2004) Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol.* 35 (4): 275-280.
- Sav H, Ozdemir HG, Altunbas R, Kiraz N, Ilkit M, Seyedmousavi S** (2016) Virulence attributes and antifungal susceptibility profile of opportunistic fungi isolated from ophthalmic infections. *Mycopathologia.* DOI: 10.1007/s11046-016-0018-3.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S és mtsai.** (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109 (16): 6241-6246.
- Schroers HJ, O'Donnell K, Lamprecht SC és mtsai.** (2009) Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. *Mycologia.* 101 (1): 44-70.
- Shanmugam V, Kanoujia N** (2011) Biological management of vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycospersici* by plant growth-promoting rhizobacterial mixture. *Biol Control.* 57 (2): 85-93.



- Shobana CS, Mythili A, Homa M és mtsai.** (2015) *In vitro* susceptibility of filamentous fungi from mycotic keratitis to azole drugs. *J Mycol Med.* 25 (1): 44-49.
- Short DP, O'Donnell K, Thrane U és mtsai.** (2013) Phylogenetic relationships among members of the *Fusarium solani* species complex in human infections and the descriptions of *F. keratoplasticum* sp. nov. and *F. petroliphilum* stat. nov. *Fungal Genet Biol.* 53: 59-70.
- Shreaz S, Sheikh RA, Bhatia R és mtsai.** (2011) Antifungal activity of  $\alpha$ -methyl trans cinnamaldehyde, its ligand and metal complexes: promising growth and ergosterol inhibitors. *Biomaterials.* 24 (5): 923-933.
- Siatiri H, Daneshgar F, Siatiri N, Khodabande A** (2011) The effects of intrastromal voriconazole injection and topical voriconazole in the treatment of recalcitrant *Fusarium* keratitis. *Cornea.* 30 (8): 872-875.
- Snyder WC, Hansen HN** (1940) The species concept in *Fusarium*. *Am J Bot.* 27: 64-67.
- Snyder WC, Hansen HN** (1941) The species concept in *Fusarium* with reference to section Martiella. *Am J Bot.* 27 (9): 738-742.
- Snyder WC, Hansen HN** (1945) The species concept in *Fusarium* with reference to *Discolor* and other sections. *Am J Bot.* 32 (10): 657-666.
- Soković M, Glamoclija J, Cirić A és mtsai.** (2008) Antifungal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* L. and thymol on experimentally induced dermatomycoses. *Drug Dev Ind Pharm.* 34 (12): 1388-1393.
- Soltis PS, Soltis DE** (2003) Applying the bootstrap in phylogeny reconstruction. *Stat Sci.* 18 (2): 256-267.
- Söderberg TA, Johansson A, Gref R** (1996) Toxic effects of some conifer resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells. *Toxicology.* 107 (2): 99-109.
- Srinivasan M** (2004) Fungal keratitis. *Curr Opin Ophthalmol.* 15 (4): 321-327.
- Srinivasan M** (2007) Infective keratitis: a challenge to Indian ophthalmologists. *Indian J Ophthalmol.* 55 (1): 5-6.
- Summerell BA, Laurence MH, Liew ECY, Leslie JF** (2010) Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Divers.* 44 (1): 3-13.
- Sun S, Lyu Q, Han L és mtsai.** (2015) Molecular identification and *in vitro* susceptibility of *Fusarium* from fungal keratitis in central China. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 51 (9): 660-667.

- Tan AL, Cha KS** (2008) *In vitro* activities of antifungal drugs against yeasts isolated from blood cultures and moulds isolated from various clinically significant sites in Singapore. *Ann Acad Med Singapore*. 37 (10): 841-846.
- Terzi V, Morcia C, Faccioli P, Valè G, Tacconi G, Malnati M** (2007) *In vitro* antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. *Lett Appl Microbiol*. 44 (6): 613-618.
- Thiel MA, Zinkernagel AS, Burhenne J, Kaufmann C, Haefeli WE** (2007) Voriconazole concentration in human aqueous humor and plasma during topical or combined topical and systemic administration for fungal keratitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 51 (1): 239-244.
- Thomas PA** (2003) Fungal infections of the cornea. *Eye*. 17 (8): 852-862.
- Tortorano AM, Prigitano A, Dho G és mtsai.** (2008) Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility patterns of 75 clinical isolates of *Fusarium* spp. from northern Italy. *Antimicrob Agents Chemother*. 52 (7): 2683-2685.
- Tortorano AM, Richardson M, Roilides E és mtsai.** (2014) ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clin Microbiol Infect*. 20 (Suppl 3): 27-46.
- Trajano VN, de Oliveira Lima E, de Souza SF** (2012) Antifungal activity of the essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* Blume and eugenol on *Aspergillus flavus*. *J Essent Oil Bear Pl*. 15 (5): 785-793.
- Uniyal V, Bhatt RP, Saxena S, Talwar A** (2012) Antifungal activity of essential oils and their volatile constituents against respiratory tract pathogens causing aspergilloma and aspergillosis by gaseous contact. *J Appl Nat Sci*. 4 (1): 65-70.
- Unoura K, Miyazaki Y, Sumi Y, Tamaoka M, Sugita T, Inase N** (2011) Identification of fungal DNA in BALF from patients with home-related hypersensitivity pneumonitis. *Respir Med*. 105 (11): 1696-1703.
- van Diepeningen AD, Al-Hatmi AMS, Brankovics B, de Hoog GS** (2014) Taxonomy and clinical spectra of *Fusarium* species: where do we stand in 2014? *Curr Clin Microbiol Rep*. 1 (1): 10-18.
- van Diepeningen AD, Brankovics B, Iltes J, van der Lee TA, Waalwijk C** (2015) Diagnosis of *Fusarium* infections: approaches to identification by the clinical mycology laboratory. *Curr Fungal Infect Rep*. 9 (3): 135-143.
- van Diepeningen AD, de Hoog GS** (2016) Challenges in *Fusarium*, a trans-kingdom pathogen. *Mycopathologia*. 81 (3-4): 161-163.

- Varga J** (2003) Molecular detection of fungi in foods and feeds. In: Arora KD (szerk.) Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications. CRC Press, Boca Raton. DOI: 10.1201/9780203913369.ch27.
- Vasantha Ruban V, Geraldine P, Kaliamurthy J, Jesudasan CA, Thomas PA** (2015) Keratitis due to *Fusarium langsethiae*: clinical profile, molecular identification, and susceptibility to antifungals. Mycopathologia. 179 (5-6): 453-458.
- Vitoratos A, Bilalis D, Karkanis A, Efthimiadou A** (2013) Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. Not Bot Horti Agrobo. 41 (1): 86-92.
- Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J, Perez-Alvarez** (2008) Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. Food Control. 19 (12): 1130-1138.
- Voigt CA, Schafer W, Salomon S** (2005) A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. Plant J. 42 (3): 364-375.
- Wang H, Xiao M, Kong F és mtsai.** (2011) Accurate and practical identification of 20 *Fusarium* species by seven-locus sequence analysis and reverse line blot hybridization, and an *in vitro* antifungal susceptibility study. J Clin Microbiol. 49 (5): 1890-1898.
- Westphal A, Abney TS, Xing LJ, Shaner GE** (2008) Sudden death syndrome of soybean. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-I-2008-0102-01.
- Wollenweber HW, Reinking OA** (1935) Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Paul Parey, Berlin.
- Xing Y, Li X, Xu Q, Yun J, Lu Y** (2010) Antifungal activities of cinnamon oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* *in vitro* and *in vivo* fruit test. Int J Food Sci Technol. 45 (9): 1837-1842.
- Zhang N, O'Donnell K, Sutton DA és mtsai.** (2006) Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. J Clin Microbiol. 44 (6): 2186-2190.

## 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, aki lehetővé tette, támogatta és segítette MSc szakdolgozói és PhD munkámat a Szegedi Tudományegyetem, TTIK, Mikrobiológiai Tanszékén.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Galgóczi Lászlónak és Dr. Kredics Lászlónak, akik az elmúlt évek során irányították, figyelemmel kísérték és hasznos tanácsokkal segítettek munkámat. Köszönöm belém fektetett bizalmukat, türelmüket és bátorításukat.

Köszönöm a 312. labor valamennyi munkatársának szakmai segítségüket és barátságukat. Külön szeretném megköszönni Dr. Baranyi Nikolettnek, Dr. Kovács Laurának, Dr. Krizsán Krisztinának, Tóth Liliánának, Vidács Anitának és Dr. Virágh Máténak, hogy az elmúlt évek során nemcsak a kísérletes munkák során nyújtottak segítséget, hanem mindig türelemmel és barátsággal fordultak hozzám, bátorítottak, és ezzel nagyban hozzájárultak a dolgozatom elkészüléséhez.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Shobana Senthilkumarnak, Dr. Palanisamy Manikandannak, Dr. Y. Randhir Babu Singhnek, Mythili Arumugannak, Gomathi Perumalnak és minden kedves indiai kollégánknak és barátunknak, hogy a dolgozat alapját képező törzseket rendelkezésünkre bocsátották, munkámat segítették és indiai tartózkodásomat felejtethetlenné tették.

Köszönettel tartozom volt szakdolgozóinknak, Dunai Anettnak, Fekete Ildikó Pálmának és Vörös Dórának, akik munkájukkal szintén hozzájárultak a dolgozathoz szükséges kutatási eredményekhez.

Köszönöm Dr. Böszörményi Andreának a gázkromatográfiás vizsgálatokban nyújtott segítségét és Nagy G. Lászlónak, hogy segítségével a filogenetikai analízisek mind elméleti mind gyakorlati alapjait elsajátíthattam. Köszönet illeti Nacsa-Farkas Elvirát a törzsek fenntartásában nyújtott munkájáért.

Emellett köszönetemet fejezem ki a tanszék valamennyi volt és jelenlegi munkatársának és mindazoknak, akik bármilyen módon segítettek a dolgozat elkészültét.

Szeretném megköszönni barátaimnak, elsősorban Fiser Gabriellának, Marsalek Csillának, Sordje Timeának és Lovas Sándornak türelmüket és lelki támogatásukat.

Végül, de nem utolsósorban külön köszönet illeti szüleimet és nővéremet, illetve családom valamennyi tagját, akik szeretetükkel és támogatásukkal segítettek tanulmányaimat.

A disszertáció a "Új utak a természetes anyag alapú gyógyszerkutatásban: rendszermetabolomikai megközelítések növényi és mikrobiális eredetű bioaktív terpenoidok felkutatására" (GINOP-2.2.1-15-2016-00012) és a "Mikrobiális génbankoz kapcsolódó integrált élettudományi és hatóanyag kutatás-fejlesztési centrum" (GINOP-2.3.3-15-2016-00006) című projektek támogatásával készült (Széchenyi 2020 Program).

## 11. MELLÉKLETEK

### 1. melléklet: A kísérletek során felhasznált *Fusarium* izolátumok listája.

KLINIKAI IZOLÁTUMOK, 2010-2011					
Törzsgyűjteményi azonosító <sup>a</sup>	Laboratóriumi azonosító	Forrás/ Izolálás helye	Törzsgyűjteményi azonosító <sup>a</sup>	Laboratóriumi azonosító	Forrás/ Izolálás helye
SZMC 11474	587/10	Keratomikózis / India	SZMC 11494	69/11	Keratomikózis / India
SZMC 11475	608/10	Keratomikózis / India	SZMC 11495	83/11	Keratomikózis / India
SZMC 11527	668/10	Keratomikózis / India	SZMC 11496	84/11	Keratomikózis / India
SZMC 11528	691/10	Keratomikózis / India	SZMC 11522	87/11	Keratomikózis / India
SZMC 11477	721/10	Keratomikózis / India	SZMC 11497	90/11	Keratomikózis / India
SZMC 11478	733/10	Keratomikózis / India	SZMC 11498	107/11	Keratomikózis / India
SZMC 11479	748/10	Keratomikózis / India	SZMC 11499	117/11	Keratomikózis / India
SZMC 11480	755/10	Keratomikózis / India	SZMC 11500	135/11	Keratomikózis / India
SZMC 11516	768/10	Keratomikózis / India	SZMC 11538	171/11	Keratomikózis / India
SZMC 11481	780/10	Keratomikózis / India	SZMC 11501	173/11	Keratomikózis / India
SZMC 11529	822/10	Keratomikózis / India	SZMC 11502	199/11	Keratomikózis / India
SZMC 11483	824/10	Keratomikózis / India	SZMC 11523	296/11	Keratomikózis / India
SZMC 11484	1024/10	Keratomikózis / India	SZMC 11539	368/11	Keratomikózis / India
SZMC 11517	1036/10	Keratomikózis / India	SZMC 11540	375/11	Keratomikózis / India
SZMC 11530	1040/10	Keratomikózis / India	SZMC 11503	378/11	Keratomikózis / India
SZMC 11485	1066/10	Keratomikózis / India	SZMC 11504	394/11	Keratomikózis / India
SZMC 11518	1096/10	Keratomikózis / India	SZMC 11505	395/11	Keratomikózis / India
SZMC 11531	1105/10	Keratomikózis / India	SZMC 11541	405/11	Keratomikózis / India
SZMC 11486	1129/10	Keratomikózis / India	SZMC 11506	437/11	Keratomikózis / India
SZMC 11532	1145/10	Keratomikózis / India	SZMC 11542	450/11	Keratomikózis / India
SZMC 11533	1167/10	Keratomikózis / India	SZMC 11524	451/11	Keratomikózis / India
SZMC 11534	1188/10	Keratomikózis / India	SZMC 11543	462/11	Keratomikózis / India
SZMC 11535	1202/10	Keratomikózis / India	SZMC 11508	463/11	Keratomikózis / India

**1. melléklet** Klinikai izolátumok, 2010-2011 (folytatás)

Törzsgyűjteményi azonosító <sup>a</sup>	Laboratóriumi azonosító	Forrás/ Izolálás helye	Törzsgyűjteményi azonosító <sup>a</sup>	Laboratóriumi azonosító	Forrás/ Izolálás helye
SZMC 11487	1264/10	Keratomikózis / India	SZMC 11509	464/11	Keratomikózis / India
SZMC 11488	1267/10	Keratomikózis / India	SZMC 11547	482/11	Keratomikózis / India
SZMC 11489	1296/10	Keratomikózis / India	SZMC 11548	487/11	Keratomikózis / India
SZMC 11519	1320/10	Keratomikózis / India	SZMC 11511	508/11	Keratomikózis / India
SZMC 11520	1345/10	Keratomikózis / India	SZMC 11512	528/11	Keratomikózis / India
SZMC 11536	1373/10	Keratomikózis / India	SZMC 11544	574/11	Keratomikózis / India
SZMC 11490	1379/10	Keratomikózis / India	SZMC 11513	589/11	Keratomikózis / India
SZMC 11537	1395/10	Keratomikózis / India	SZMC 11545	598/11	Keratomikózis / India
SZMC 11521	1449/10	Keratomikózis / India	SZMC 11546	609/11	Keratomikózis / India
SZMC 11491	1452/10	Keratomikózis / India	SZMC 11514	615/11	Keratomikózis / India
SZMC 11492	20/11	Keratomikózis / India	SZMC 11525	981/11	Keratomikózis / India
SZMC 11493	49/11	Keratomikózis / India	SZMC 11515	1079/11	Keratomikózis / India
<b>KLINIKAI FSSC<sup>b</sup> IZOLÁTUMOK, 2012</b>					
SZMC 21310	1217/12	Keratomikózis / India	SZMC 21319	1176/12	Keratomikózis / India
SZMC 21311	1174/12	Keratomikózis / India	SZMC 21320	1206/12	Keratomikózis / India
SZMC 21312	1157/12	Keratomikózis / India	SZMC 21321	1140/12	Keratomikózis / India
SZMC 21313	1218/12	Keratomikózis / India	SZMC 21323	1141/12	Keratomikózis / India
SZMC 21314	1168/12	Keratomikózis / India	SZMC 21324	1146/12	Keratomikózis / India
SZMC 21315	1132/12	Keratomikózis / India	SZMC 21325	1209/12	Keratomikózis / India
SZMC 21316	1156/12	Keratomikózis / India	SZMC 21326	1257/12	Keratomikózis / India
SZMC 21317	1253/12	Keratomikózis / India	SZMC 21327	1272/12	Keratomikózis / India
SZMC 21318	1223/12	Keratomikózis / India	SZMC 21328	1335/12	Keratomikózis / India
<b>ÁLTALUNK IZOLÁLT KÖRNYEZETI FSSC<sup>b</sup> IZOLÁTUMOK, 2012</b>					
SZMC 21329	SF1	Talaj / Coimbatore, India	SZMC 21340	SF14	Talaj / Coimbatore, India
SZMC 21330	SF2	Talaj / Coimbatore, India	SZMC 21341	SF15	Talaj / Coimbatore, India

**1. melléklet** Átalunk izolált környezeti FSSC<sup>b</sup> izolátumok (folytatás)

Törzsgyűjteményi azonosító <sup>a</sup>	Laboratóriumi azonosító	Forrás / Izolálás helye	Törzsgyűjteményi azonosító <sup>a</sup>	Laboratóriumi azonosító	Forrás / Izolálás helye
SZMC 21331	SF5	Talaj / Coimbatore, India	SZMC 21342	SF16	Talaj / Coimbatore, India
SZMC 21332	SF6	Talaj / Coimbatore, India	SZMC 21343	SF17	Talaj / Coimbatore, India
SZMC 21333	SF7	Talaj / Coimbatore, India	SZMC 21344	SF18	Talaj / Coimbatore, India
SZMC 21334	SF8	Talaj / Coimbatore, India	SZMC 21345	SF19	Talaj / mezőgazdasági terület, India
SZMC 21335	SF9	Talaj / Coimbatore, India	SZMC 21346	SF20	Talaj / mezőgazdasági terület, India
SZMC 21336	SF10	Talaj / Coimbatore, India	SZMC 21348	SF22	Talaj / mezőgazdasági terület, India
SZMC 21337	SF11	Talaj / Coimbatore, India	SZMC 21350	PF16	<i>Sorghum</i> sp. / India
SZMC 21338	SF12	Talaj / Coimbatore, India	SZMC 21351	PF17	<i>Solanum lycopersicum</i> / India
SZMC 21339	SF13	Talaj / Coimbatore, India			
<b>EGYÉB KÖRNYEZETI MINTÁBÓL SZÁRMAZÓ FSSC<sup>b</sup> IZOLÁTUMOK</b>					
CBS 115659	PF1	<i>Solanum tuberosum</i> / Németország	CBS 266.50	PF13	<i>Pisum sativum</i> / -
CBS 115660	PF2	<i>Solanum tuberosum</i> / Egyiptom	CBS 310.75	PF14	<i>Pisum sativum</i> / -
CBS 117481	PF3	<i>Liriodendron tulipifera</i> / USA	MTCC 350	-	<i>Citrus</i> spp. / India
CBS 181.29	PF4	<i>Solanum tuberosum</i> / Németország	MTCC 2671	-	<i>Malus</i> spp. levél / India
CBS 119223	PF5	<i>Daucus carota</i> / Spanyolország	MTCC 2935	-	<i>Ipomoea batatas</i> / India
CBS 124665	PF6	<i>Juglans nigra</i> / USA	MTCC 3269	-	Ismeretlen növény / India
CBS 124666	PF7	<i>Juglans nigra</i> / USA	MTCC 3797	-	Ismeretlen növény / India
CBS 119996	PF8	<i>Daucus carota</i> / Hollandia	MTCC 9396	-	Ismeretlen növény / India
CBS 835.85	PF9	<i>Phaseolus vulgaris</i> / Németország	MTCC 9622	-	Ismeretlen növény / India
CBS 265.50	PF10	<i>Phaseolus</i> spp. / USA	MTCC 9667	-	Ismeretlen növény / India
CBS 190.35	PF11	<i>Phaseolus</i> spp. / USA	MTCC 9671	-	<i>Capsicum annuum</i> / India
CBS 309.75	PF12	<i>Pisum sativum</i> / -			



**1. melléklet** Egyéb környezeti mintából származó FSSC<sup>b</sup> izolátumok (folytatás)

EGYÉB IZOLÁTUMOK					
Törzsgyűjteményi azonosító <sup>a</sup>	Forrás	Fajkomplexum <sup>c</sup> /Faj	Törzsgyűjteményi azonosító <sup>a</sup>	Forrás	Fajkomplexum <sup>c</sup> /Faj
SZMC 11049	-	FSAMSC, <i>F. boothii</i>	SZMC 11038	-	FSAMSC, <i>F. pseudograminearum</i>
SZMC 11051	-	FSAMSC, <i>F. boothii</i>	SZMC 11048	-	FSAMSC, <i>F. cerealis</i>
SZMC 11056	-	FSAMSC, <i>F. graminearum</i>	NRRL 29365	USA	FSAMSC, <i>F. culmorum</i>
SZMC 11044	-	FTSC, <i>F. avenaceum</i>	NRRL 29388	USA	FSAMSC, <i>F. culmorum</i>
SZMC 11055	-	FSAMSC, <i>F. asiaticum</i>	SZMC 11042	-	FCOSC, <i>F. polyphialidicum</i>

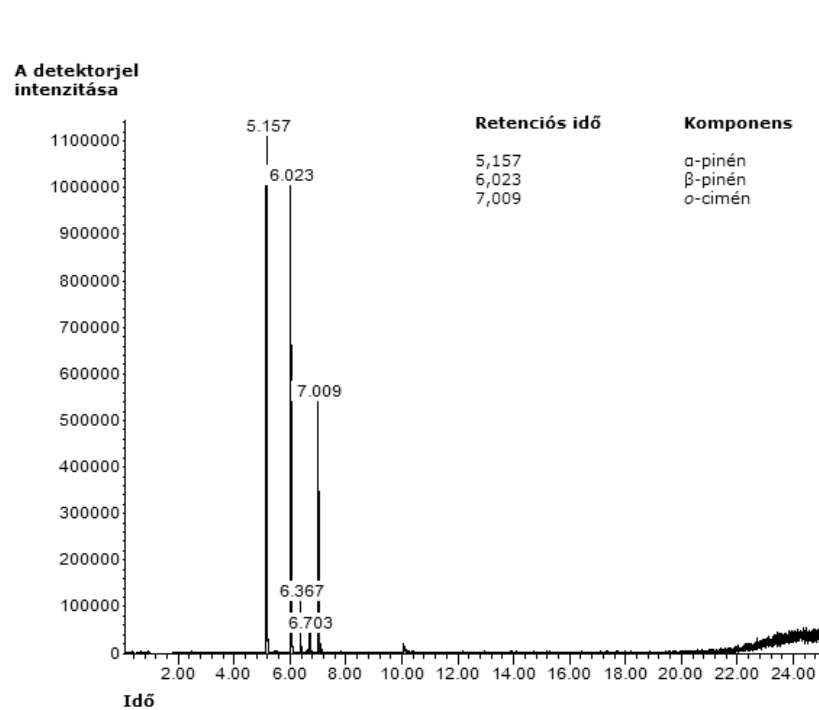
<sup>a</sup>**CBS:** Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Hollandia; **SZMC:** Szeged Microbiological Collection, Szeged, Magyarország; **MTCC:** The Microbial Type Culture Collection and Gene Bank, Chandigarh, India; **NRRL:** Northern Regional Research Laboratory, Agricultural Research Service Culture Collection (ARSCC), National Center for Agricultural Utilization Research (NCAUR), Peoria, USA

<sup>b</sup>**FSSC:** *F. solani* fajkomplexum.

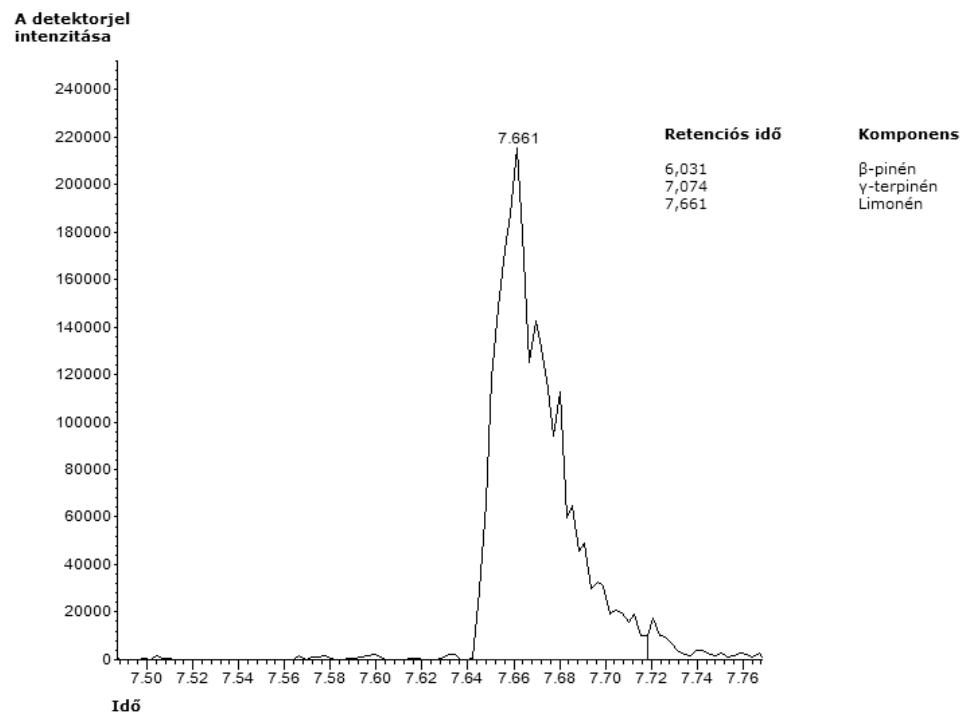
<sup>c</sup>**FCOSC,** *F. concolor* fajkomplexum; **FSAMSC:** *F. sambucinum* fajkomplexum (azonos a *F. graminearum* fajkomplexummal); **FTSC,** *F. tricinctum* fajkomplexum.

**2. melléklet: A dolgozatban szereplő illóolajok GC-MS kromatogramjai. a, borókaolaj; b, citromolaj; c, citromos eukaliptuszolaj; d, fahéjolaj; e, kakukkfűolaj; f, kúszó fajdbogyóolaj; g, majorannaolaj; h, muskotályzsályaolaj; i, teafaolaj.**

**a,**



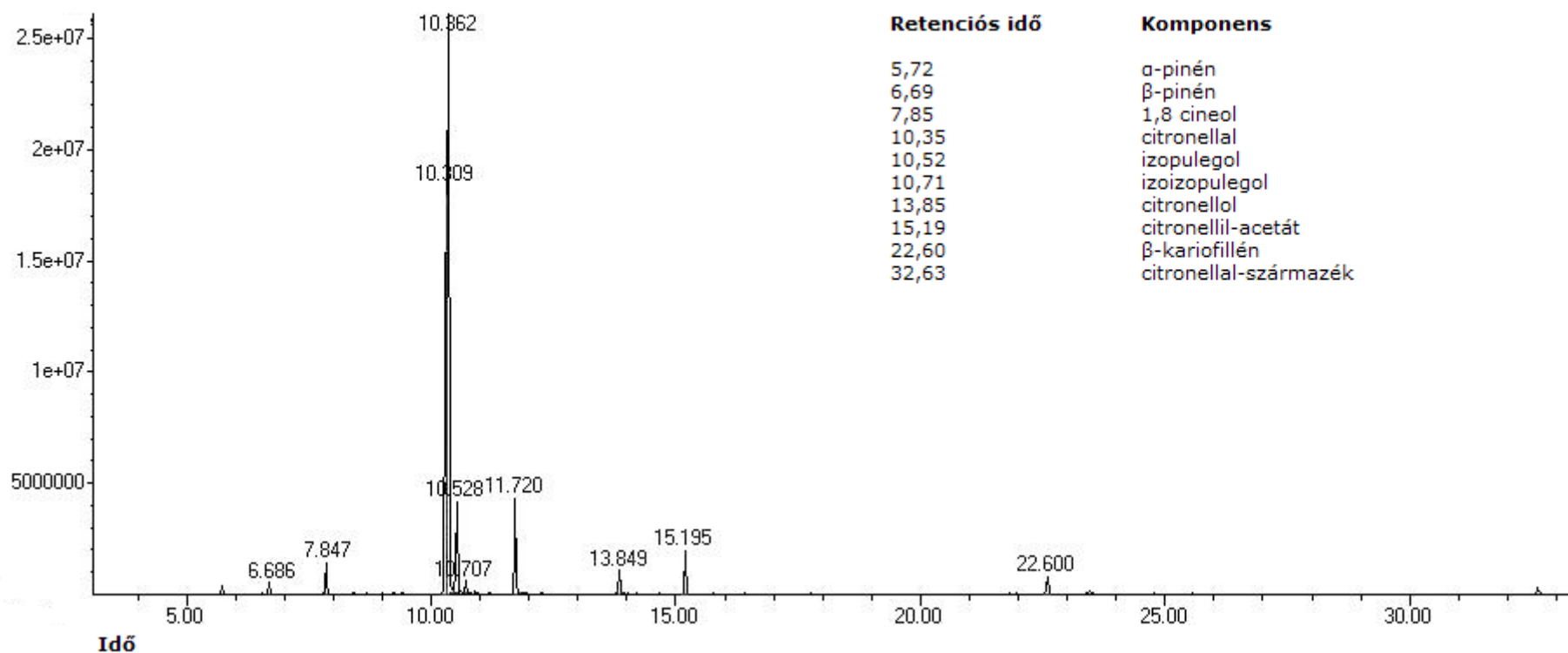
**b,**



## 2. melléklet (folytatás)

c,

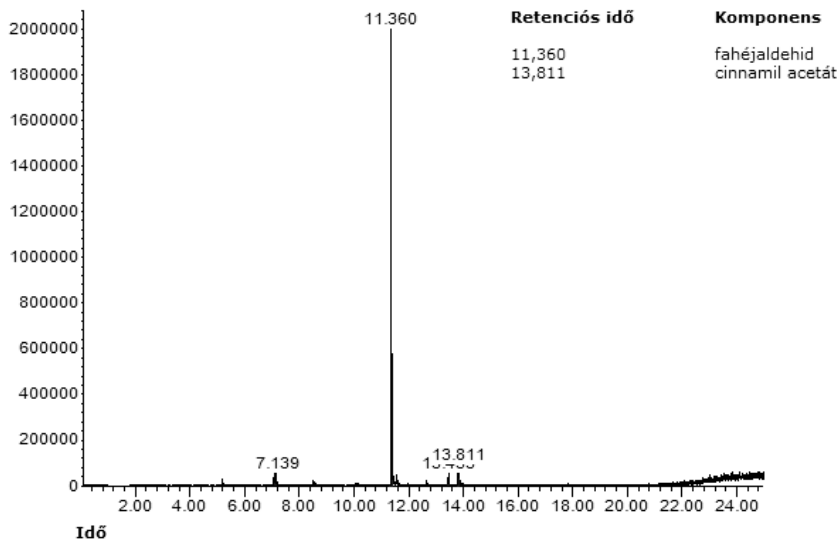
**A detektorjel  
intenzitása**



## 2. melléklet (folytatás)

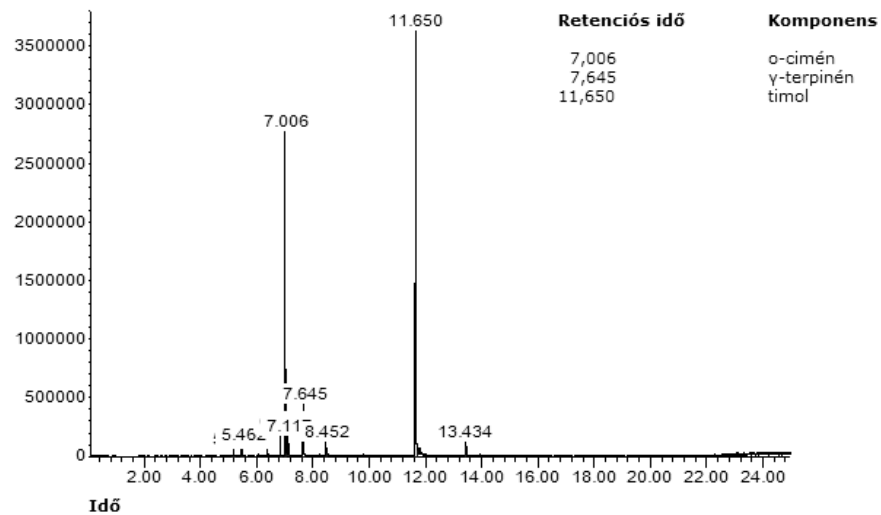
d,

A detektorjel  
intenzitása



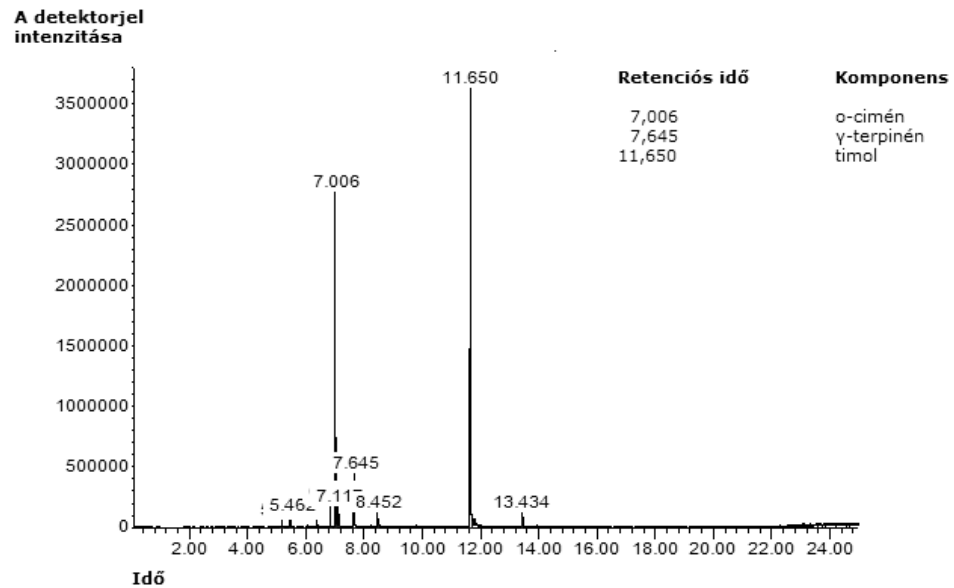
e,

A detektorjel  
intenzitása

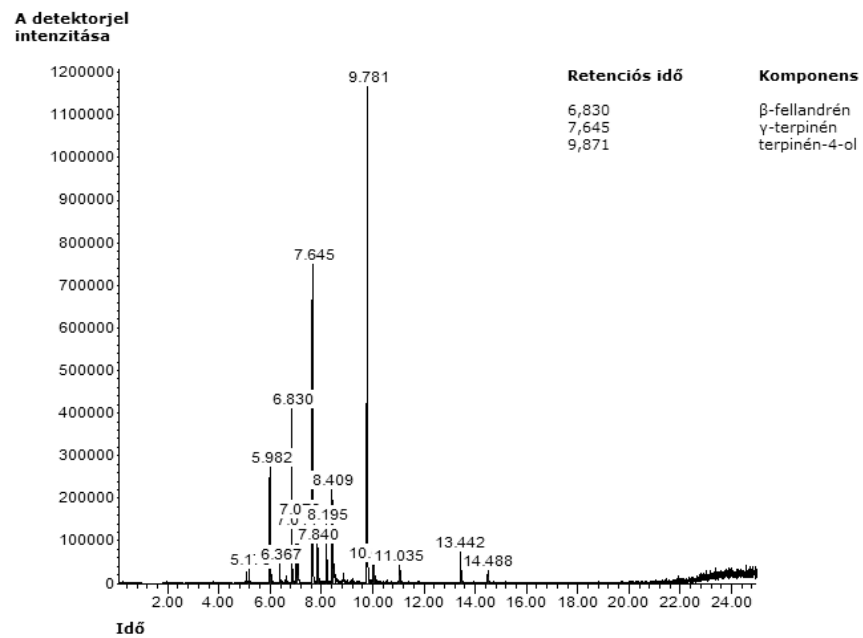


## 2. melléklet (folytatás)

f,

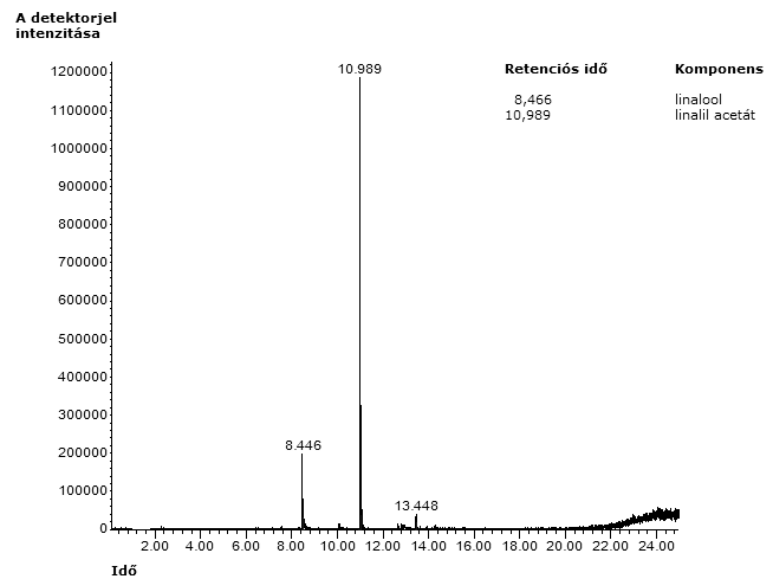


g,

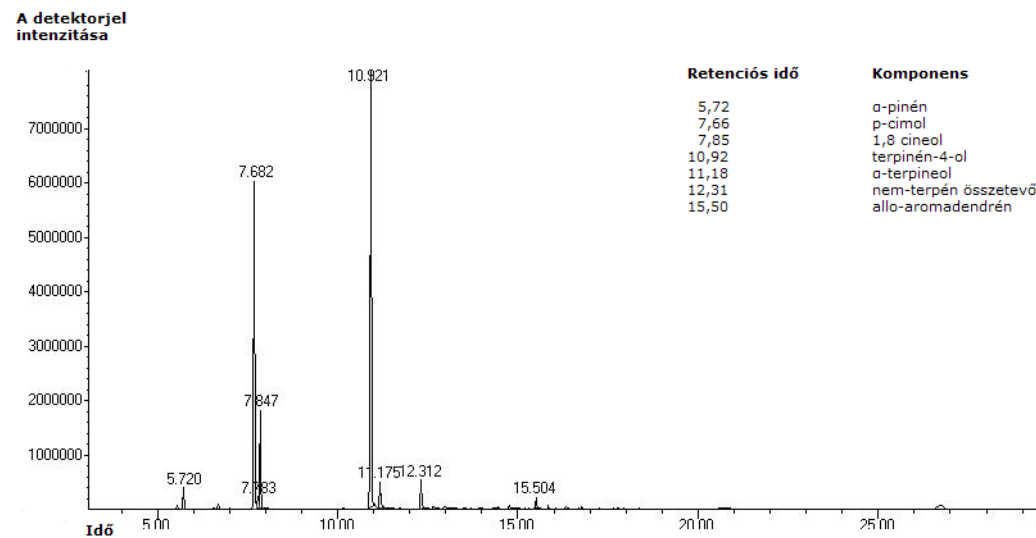


## 2. melléklet (folytatás)

h,



i,



**3. melléklet: Klinikai és környezeti *Fusarium solani* fajkomplexumhoz tartozó izolátumok extracelluláris enzimaktivitását jellemző enzimaktivitási index értékek.**

Izolátum <sup>a</sup>	Celluláz	Elasztáz	Fosfolipáz	Kazeináz	Keratináz	Lipáz	Pektináz	Izolátum <sup>a</sup>	Celluláz	Elasztáz	Fosfolipáz	Kazeináz	Keratináz	Lipáz	Pektináz	Izolátum <sup>a</sup>	Celluláz	Elasztáz	Fosfolipáz	Kazeináz	Keratináz	Lipáz	Pektináz
Klinikai izolátumok(n=23)								Növényekről származó izolátumok (n=25)								Talajból származó izolátumok (n=19)							
SZMC 11474	1,0	0,0	1,6	1,1	2,4	1,1	1,2	CBS 115659	1,0	0,0	1,2	1,0	1,2	2,7	1,1	SZMC 21329	1,4	1,0	1,4	1,0	3,1	1,3	1,1
SZMC 11528	1,5	0,0	1,2	1,0	2,3	1,1	1,3	CBS 115660	1,1	0,0	1,7	1,0	1,2	2,9	1,2	SZMC 21330	1,2	0,0	1,2	1,0	1,5	1,3	1,1
SZMC 11518	1,7	1,0	1,2	1,0	2,6	1,2	1,0	CBS 117481	1,0	0,0	1,5	0,0	1,0	2,7	1,1	SZMC 21331	1,4	0,0	1,2	0,9	2,5	1,4	1,2
SZMC 11525	1,3	0,0	1,1	0,9	2,9	1,1	1,0	CBS 181.29	1,0	0,0	1,2	2,4	1,8	2,2	1,2	SZMC 21332	1,0	0,0	1,2	0,9	1,7	1,2	1,1
SZMC 11515	1,4	0,0	1,0	0,9	2,3	1,2	1,1	CBS 119223	1,0	0,0	1,4	1,2	1,2	2,6	1,0	SZMC 21333	1,5	0,0	1,3	1,0	1,8	1,3	1,1
SZMC 21315	1,0	0,0	1,4	1,0	3,5	1,4	1,1	CBS 124665	1,0	0,0	1,4	1,0	2,0	2,4	1,1	SZMC 21334	1,0	0,0	1,1	1,0	1,6	1,3	1,1
SZMC 21321	1,5	1,3	1,1	1,0	2,0	1,4	1,1	CBS 124666	1,0	0,0	1,6	0,0	1,4	2,3	1,2	SZMC 21335	1,2	0,0	1,6	0,0	1,8	1,3	1,1
SZMC 21323	1,1	0,0	1,9	0,0	2,1	1,3	1,1	CBS 119996	1,0	0,0	1,4	0,0	1,4	2,1	1,1	SZMC 21336	1,0	0,0	1,6	0,0	1,6	1,2	1,1
SZMC 21324	1,7	1,1	1,0	1,0	2,1	1,3	1,1	CBS 835.85	2,1	0,0	1,5	0,0	1,7	1,5	2,1	SZMC 21337	1,0	0,0	1,4	1,0	2,3	1,3	1,1
SZMC 21316	1,3	0,0	1,1	1,0	2,1	1,3	1,0	CBS 265.50	1,1	0,0	1,8	0,0	1,8	3,7	1,1	SZMC 21338	1,0	0,0	1,3	1,0	1,9	1,2	1,1
SZMC 21312	1,0	1,7	1,1	1,0	2,1	1,4	1,1	CBS 190.35	1,3	1,0	1,1	0,5	2,4	2,4	1,0	SZMC 21339	1,1	2,2	1,3	1,0	1,7	1,2	1,0
SZMC 21314	1,0	0,0	1,1	1,0	1,8	1,4	1,1	CBS 309.75	1,0	0,0	1,1	0,5	1,1	1,7	1,3	SZMC 21340	1,0	0,0	1,4	0,0	2,0	1,3	1,1
SZMC 21311	1,0	0,8	1,1	1,0	1,9	1,3	1,1	CBS 266.50	1,0	0,0	1,1	1,4	2,2	2,3	1,7	SZMC 21341	1,2	0,0	1,2	0,0	1,9	1,2	1,0
SZMC 21319	1,0	0,0	1,1	1,0	2,0	1,2	1,1	CBS 310.75	1,4	0,0	1,1	1,7	1,0	3,2	1,1	SZMC 21342	1,1	0,0	1,5	1,0	1,7	1,2	1,1
SZMC 21320	1,0	0,7	1,1	0,5	1,6	1,1	1,1	SZMC 21350	1,4	0,0	1,3	0,9	2,0	1,3	1,3	SZMC 21343	1,7	1,1	1,3	0,9	2,1	1,3	1,0
SZMC 21325	1,1	0,0	1,1	0,9	2,2	1,3	1,1	SZMC 21351	1,6	0,9	1,3	0,9	2,1	1,1	1,1	SZMC 21344	1,0	0,0	1,1	0,0	1,5	1,3	1,3
SZMC 21310	1,1	0,0	1,0	1,0	1,8	1,2	1,1	MTCC 350	1,9	0,0	1,3	0,0	n.a. <sup>b</sup>	1,2	1,1	SZMC 21345	1,4	0,9	1,1	1,0	1,9	1,4	1,1
SZMC 21313	1,0	0,0	1,2	1,0	2,4	1,3	1,2	MTCC 2671	1,1	0,0	1,4	0,0	1,6	2,6	1,1	SZMC 21346	1,1	0,0	1,2	1,0	1,7	1,3	1,1
SZMC 21318	1,0	1,8	1,1	1,0	2,1	1,2	1,1	MTCC 2935	1,0	0,0	1,4	0,0	n.a. <sup>b</sup>	1,3	1,0	SZMC 21348	1,2	0,0	1,2	0,0	1,7	1,4	1,1
SZMC 21317	1,4	0,0	1,4	0,0	2,1	1,2	1,1	MTCC 3269	1,1	1,0	1,0	0,0	n.a. <sup>b</sup>	1,3	1,0								
SZMC 21326	1,0	1,1	1,2	0,9	3,0	1,2	1,0	MTCC 3797	1,0	0,6	1,3	0,0	1,5	1,2	1,0								
SZMC 21327	1,1	1,0	1,1	1,0	1,8	1,2	1,1	MTCC 9396	1,7	1,0	1,1	0,0	2,0	1,1	1,0								
SZMC 21328	1,5	0,4	1,3	0,9	2,0	1,4	1,1	MTCC 9622	1,3	0,0	1,2	0,0	2,3	1,4	1,1								
								MTCC 9667	1,3	0,0	1,1	0,8	1,9	1,4	1,3								
								MTCC 9671	1,4	0,0	1,3	0,0	1,9	1,2	1,2								
Átlag	1,2	0,5	1,2	0,9	2,1	1,2	1,1		1,2	0,2	1,3	0,5	1,7	2,1	1,2		1,2	0,3	1,3	0,7	1,9	1,3	1,1
Szórás	0,2	0,6	0,2	0,3	0,4	0,1	0,1		0,3	0,4	0,2	0,7	0,4	0,4	0,2		0,2	0,6	0,2	0,5	0,4	0,1	0,1

<sup>a</sup>CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Hollandia; SZMC, Szeged Microbiological Collection, Szeged, Magyarország; MTCC, The Microbial Type Culture Collection and Gene Bank, Chandigarh, India. <sup>b</sup>n.a., nincs adat.