DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

HUMÁN PATOGÉN *CANDIDA* FAJOK MOLEKULÁRIS KIMUTATÁSA ÉS JELLEMZÉSE

Kocsubé Sándor

Témavezető: Dr. Varga János

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék

Szeged

2012

BEVEZETÉS

A *Candida* nemzetség közel 200 faja közül körülbelül 20 ismert, mint lehetséges humán patogén, élükön a *Candida albicans*-szal. A 80-as években a legtöbb megbetegedést a *C. albicans* okozta, azonban az 1990-es évektől napjainkig jelentős epidemiológiai változás állt be. A fertőzések túlnyomó többségéért jelenleg is a *C. albicans* tehető felelőssé, azonban a nem-albicans fajok (NAC, non-albicans *Candida*, nem-albicans *Candida*), mint a *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii* és *Candida lusitaniae* okozta fertőzések számának jelentős emelkedését figyelték meg. A 90-es évekig két évtizeden keresztül a fertőzések mintegy 10-40%-át okozták NAC fajok, míg 1990-től 35-60%-ra emelkedett a nem-albicans fajok által okozott megbetegedések aránya.

Az epidemiológiai váltás valószínűleg a flukonazol fokozott használatának köszönhető, melyekre a *C. krusei* elsődleges, a *C. glabrata* másodlagos rezisztenciát mutat. Kimutatták, hogy a felhasznált flukonazol mennyisége és a NAC fajok klinikai mintákban tapasztalt gyakorisága között szignifikáns az összefüggés. Egyre elterjedtebb az antifungális szerek megelőzésként történő adagolása is, ami ugyan hatékonyan véd a *C. albicans* fertőzések ellen, de kevésbé a NAC fajok ellen. A nem-albicans fajok virulenciája általában alacsonyabb, mint a *C. albicans*-é, mégis az általuk okozott megbetegedések mortalitása a gomba elsődleges, vagy másodlagos rezisztenciájából fakadóan akár a 70%-ot is elérheti. A váltás hátterében meghúzódhat még a sebészeti beavatkozások számának növekedése, a kemoterápiás szerek alkalmazásának emelkedése és a HIV-fertőzöttek arányának növekedése is. Ugyanakkor a diagnosztikai technikák fejlődése is hozzájárulhat a leírt nem-albicans fajok által okozott fertőzések számának emelkedéséhez.

Ha a klinikai kezelések során bebizonyosodik, hogy a beteg valamely *Candida* faj által fertőzött, akkor a kezelést elsősorban amfotericin B és/vagy flukonazol használatával kezdik. *Candida* törzsek esetében igen fontos a pontos, fajszintű azonosítás, mivel a különböző fajok igen eltérő módon érzékenyek a különböző antifungális szerekkel szemben. A helyes terápiás szer megválasztását nehezíti, hogy számos *Candida* faj eredendően érzéketlen vagy képes igen gyorsan rezisztenciát kialakítani a leggyakrabban alkalmazott azolokkal és poliénekkel, elsősorban az amfotericin B-vel és a flukonazollal szemben.

CÉLKITŰZÉSEK

A nem-albicans fajok által okozott fertőzések számának emelkedése, és az egyre sűrűbben megjelenő antifungális szerekkel szembeni rezisztenca igen fontossá teszi a *Candida* fajok pontos, fajszintű azonosítását. Mindezek alapján a következő célokat fogalmaztuk meg:

1. Egy hatékony, a klinikai diagnosztizálásban is könnyen felhasználható PCR-alapú fajazonosítási módszer kidolgozása a *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* és *C. lusitaniae* fajokra.
2. A *C. parapsilosis* magyarországi klinikai izolátumainak genetikai jellemzése és antifungális szerekkel szembeni érzékenységük vizsgálata.
3. Antifungális szerek és különböző sztatinok kölcsönhatásainak vizsgálata *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* és *C. guilliermondi* izolátumok esetében.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Klasszikus mikrobiológiai módszerek:

- Törzsek fenntartása
- Szénforrás asszimilációs tesztek
- *In vitro* antifungális érzékenységi vizsgálatok mikrodilúciós módszer alkalmazásával
- *In vitro* antifungális érzékenységi vizsgálatok Etest segítségével
- Antifungális szerek és sztatinok kölcsönhatásainak vizsgálata checkerboard-titrálás segítségével

DNS alapú technikák:

- DNS-tisztítás
- Polimeráz láncreakció (PCR, multiplex PCR)
- DNS-szekvenálás
- RAPD analízis

Nukleotid szekvenciák elemzése:

- Nukleotid szekvenciák analízise és ellenőrzése (BLAST)
- Nukleotid szekvenciák illesztése (CLUSTALX)
- Filogenetikai analízis
- Specifikus indítószekvenciák tervezése

EREDMÉNYEK

Molekuláris kimutatási módszer kifejlesztése patogén *Candida* fajok kimutatására (Beszedics és mtsai., 2008)

Kutatócsoportunk kifejlesztett egy gyors PCR alapú kimutatási rendszert, mellyel a leggyakrabban előforduló humán patogén *Candida* fajok közül kilencet lehet teljes biztonsággal azonosítani.

A kimutatási reakciók első csoportját az rDNS-génkomplexre terveztük, és nyolc *Candida* faj (*C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata, C. albicans*, *C. dubliniensis, C. tropicalis, C. parpapsilosis sensu lato*) azonosítására volt alkalmas. Célunk egy olyan multiplex PCR technika kidolgozása volt, mely minden faj esetében egyedi méretű amplikont eredményez. A nyolc fajt két csoportra osztva terveztünk egy-egy csoportra specifikus és nyolc fajspecifikus indítószekvenciát. Az első, 5,8S rRNS-régióra tervezett közös indítószekvenciával rendelkező csoportba a *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* és a *C. glabrata* tartozott, a második csoportot a *C. albicans*, *C. dubliniensis, C. tropicalis* és *C. parpapsilosis sensu lato* fajok alkották, melyek közös indítószekvenciáját a 18S rRNS-régióra terveztük. A kimutatási reakciókat 14 *Candida* faj (*C. albicans* ATCC 10231, *C. lusitaniae* CBS 6936, *C. krusei* CBS 573, *C. inconspicua* CBS 180, *C. dubliniensis* CBS 7987, *C. tropicalis* CBS 94, *C. norvegensis* SZMC 198, *C. pulcherrima* CBS 5833, *C. glabrata* CBS 138, *C. parapsilosis* CBS 604, *C. guilliermondii* CBS 566, *C. zeylanoides* CBS 619, *C. lipolytica* CBS 6124, *C. norvegica* CBS 4239) felhasználásával teszteltük. A reakció optimalizálása után az általunk felhasznált referenciatörzsek egyike sem eredményezett aspecifikus terméket, és a ciklusok idejének rövidítésével lehetőségünk nyílt egy megközelítőleg egy órát igénylő program kidolgozására.

Célkitűzéseink közt szerepelt egy ellenőrző reakció megtervezése is. A kimutatás alapjául egykópiás magi géneket választottunk (*FTR*, *PLD*). Az *FTR* gén általunk vizsgált szakasza nem bizonyult megfelelőnek egy megbízható fajspecifikus reakció kifejlesztésére, a *PLD* génszakasz azonban lehetővé tette a pontos kimutatásra alkalmas indítószekvenciák tervezését. A reakciókat szintén multiplex körülményekre optimalizáltuk, de ebben az esetben nem nyílt lehetőség olyan közös indítószekvenciák megtervezésére, melyek kettőnél több faj esetében is alkalmazhatóak lettek volna. A vizsgált

génszakasz nem tette lehetővé az rDNS-génkomplexre tervezett kimutatási reakciók által azonosítható összes *Candida* faj detektálását. Az azonosítható fajok közül hét megegyezett az rDNS-szakaszra tervezett indítószekvenciákkal kimutatható fajokkal (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*), de nem tette lehetővé a *C. lusitaniae* izolátumok detektálását. Lehetőségünk nyílt egy, az utóbbi években egyre több fertőzést okozó faj, a *Candida kefyr* kimutatására alkalmas reakció megtervezésére is. A kidolgozott indítószekvenciák minden esetben alkalmasnak bizonyultak a fajok pontos kimutatására, és multiplex körülmények között is alkalmazhatóak voltak.

Megvizsgáltuk a reakciók érzékenységét kolónia PCR segítségével. Az egyértelmű kimutatáshoz szükséges sejtkoncentráció a 10^4 és 10^5 sejt/ml-es koncentrációk közé esett. A *PLD* génszakaszra tervezett reakció érzékenysége a 10^5-10^6 sejt/ml-es tartományban bizonyult megfelelőnek.

A *C. parapsilosis* izolátumok genetikai variabilitása (Kocsubé és mtsai., 2007)

Munkánk során megvizsgáltuk két hazai kórházban a *C. parapsilosis* izolátumok által kiváltott fertőzések gyakoriságát, genetikai és esetleges fenotípusos variabilitását.

A *C. parapsilosis* fajon belüli genetikai variabilitását RAPD analízissel és az rDNS-génkluszter ITS régiójának szekvenciaanalízise révén vizsgáltuk. A Luo és Mitchell (2002) által tervezett, *C. parapsilosis sensu lato* csoportra specifikus indítószekvenciákkal a 26 izolátum közül 20 esetében tudtuk megerősíteni a korábbi azonosítás eredményét. A helytelenül azonosított izolátumok ITS szekvenciaanalízise alapján 2 izolátum *C. lusitaniae*-nek, 3 izolátum *C. krusei*-nek és 1 izolátum *C. albicans*-nak bizonyult.

A RAPD analízis során a 20 vizsgált izolátum között azonosítottunk egy csoportot, melyen belül nem volt tapasztalható magas heterogenitás; több indítószekvencia esetében azonos vagy nagyon hasonló RAPD-mintázatot figyelhettünk meg. Két izolátum ettől a csoporttól elkülönült, de számos esetben igen hasonló mintázattal rendelkeztek. A későbbi ITS analízis alapján ez a két izolátum *C. metapsilosis*-nak bizonyult.

A molekuláris eredményeket alátámasztotta az API 20C AUX szénforrás asszimilációs teszt is; csak a két *C. metapsilosis* izolátum volt képes a D-xilitolt szénforrásként felhasználni.

A minták antimikotikumokkal szembeni érzékenységét Etest segítségével határoztuk meg. A *C. metapsilosis* izolátumok érzékenyebbnek bizonyultak a *C. parapsilosis* izolátumoknál amfotericin B-vel és vorikonazollal szemben.

A vizsgált 209 *Candida* izolátumból 20 tartozott a tágabb értelemben vett *C. parapsilosis* fajhoz, tehát 2004-2005 során a két kórházban a kórokozó *Candida* törzsek 9,6 %-át ez a faj tette ki.

Specifikus PCR alapú azonosítást dolgoztunk ki az rDNS-génkluszter felhasználásával *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* izolátumok elkülönítésére. A génbanki és saját szekvenciák illesztéseinek elemzésekor a *C. metapsilosis* szekvenciák között jelentősebb eltéréseket tapasztaltunk, melyek két csoportra osztották a vizsgált izolátumokat. Az elkülönülő II-es csoportra specifikus indítószekvenciát terveztünk. Az indítószekvenciák a tesztelések során alkalmasnak bizonyultak a fajszintű azonosításra. A tanszékünkön található *C. parapsilosis sensu lato* izolátumok között sikeresen azonosítottunk két *C. metapsilosis* törzset, melyek a II-es csoportba tartoztak. Megvizsgáltuk két további gén, a transzlációs elongációs faktor alfa (*TEF1-α*) és a 18S rRNS-gének egy-egy szakaszát. Sem a 18S rRNS-szakaszok, sem a *TEF1-α*

génszakaszok nem bizonyultak alkalmasnak a két *C. metapsilosis* csoport egyértelmű elkülönítésére.

Antifungális szerek és sztatinok kölcsönhatásainak *in vitro* vizsgálata (Nyilasi és mtsai., 2010a,b)

A tanszékünkön folyt korábbi kutatások alkalmával meghatároztuk a ketokonazol, flukonazol, itrakonazol, primycin, amfotericin B és a nystatin, valamint a **9. Táblázatban** található sztatinok MIC-értékeit, majd elvégeztük a kombinációs kísérleteket is *Candida albicans* ATCC 90028 és *Candida glabrata* CBS 138 törzsek esetében (Nyilasi és mtsai., 2010a,b,c).

A teljes gátláshoz szükséges ketokonazol-koncentráció *C. albicans* esetében 16 µg/ml-nél magasabbnak adódott, azonban 0,5-1 µg/ml-es tartományban 100%-os gátlást értünk el a *C. glabrata* esetében. A vizsgált *C. albicans* törzs esetében a flukonazollal és az itrakonazollal végrehajtott kísérletekben szintén nem tudtuk meghatározni a teljes gátláshoz szükséges hatóanyag-koncentrációt. Az vizsgált legmagasabb koncentráció fukonazol esetében 64 µg/ml, itrakonazol esetében 16 µg/ml volt. A *C. glabrata* izolátum MIC-értéke flukonazol esetében 8-16 µg/ml-nek, itrakonazol esetében pedig 0,5 µg/ml-nek adódott. A primycin 64 µg/ml-es koncentrációban 100%-os gátlást eredményezett *C. albicans* esetében, míg a *C. glabrata*-t már 32 µg/ml-es koncentrációban is teljesen gátolta. Az amfotericin B mindkét izolátumot 100%-osan gátolta 1 µg/ml-es koncentrációban, míg a nystatin teljes gátláshoz szükséges koncentrációja *C. albicans* esetében 2 µg/ml-nek, *C. glabrata* esetében pedig 1 µg/ml-nek bizonyult.

A sztatinok közül a szimvasztatin és a fluvasztatin bizonyult a leghatékonyabbnak. A szimvasztatin 8 µg/ml-es koncentrációban teljes gátlást okozott *C. albicans* és 32 µg/ml-es koncentrációban pedig *C.*

glabrata esetében. A fluvasztatin teljes gátlást okozott a vizsgált *C. albicans* izolátum esetében 32 μg/ml-es koncentrációban. A *C. glabrata* izolátum 100%-os gátlását 64 μg/ml-es koncentrációban váltotta ki a fluvasztatin. Az atorvasztatinnal és lovasztatinnal végzett kísérletekben a teljes gátlás eléréséhez szükséges koncentráció *C. albicans*-nál 128 és 64 μg/ml-nek bizonyult, míg *C. glabrata*-nál a teljes gátlást mindkét sztatin a 128 μg/ml-es koncentrációban váltotta ki. A roszuvasztatin mindkét izolátumot teljesen gátolta 128 μg/ml-es koncentrációban. A legkevésbé hatékonynak a pravasztatin bizonyult, mely a legmagasabb vizsgált koncentrációban (128 μg/ml) sem gátolta a vizsgálatba bevont törzseket.

A kombinációs vizsgálatokban minden antifungális szer esetében ki lehetett mutatni jelentősebb additív és szinergista kombinációkat sztatinokkal. A nystatin és az amfotericin B esetében egyedül a pravasztatinnal történő kombinációk bizonyultak hatástalannak. Az azolok esetében a ketokonazol/sztatin kombinációkban a kölcsönhatások jelentősen megnövelték az antifungális szer hatékonyságát mindkét vizsgált izolátum esetében. Egyedül a pravasztatin bizonyult hatástalannak *C. albicans* esetében. A flukonazollal végzett kombinációs kísérletekben szintén jelentős hatásnövekedéseket lehetett megfigyelni minden vizsgált kombinációban, a pravasztatin kivételével. Ez a megfigyelés az itrakonazollal végzett kombinációkra is igaznak bizonyult. A primycinnel végzett kísérletekben a lovasztatin, a szimvasztatin, a fluvasztatin és az atorvasztatin bizonyultak a leghatásosabb interakciós partnereknek. Az együtthatásoknak köszönhetően a primycin teljes gátlást előidéző koncentrációja átlagosan egy hígítási lépcsővel csökkent.

Ezekre a megfigyelésekre alapozva célul tűztük ki további három *Candida* faj vizsgálatát.

Megállapítottuk a megelőző kísérletekben felhasznált antifungális szerek és sztatinok MIC értékeit *C. parapsilosis* CBS 604, *C. guilliermondii* CBS 566 és *C. tropicalis* CBS 94 izolátumok esetében kiegészítve az antifungális szereket a terbinafinnal és a griseofulvinnal. A *C. parapsilosis* és *C. guilliermondii* izolátumok vizsgálatai során a leghatékonyabb antifungális szernek a ketokonazol és az itrakonazol bizonyult, míg a sztatinok közül a szimvasztatinnal és a fluvasztatinnal sikerült jelentősebb gátlást elérni. A *C. tropicalis* izolátum a nystatin-ra, az itrakonazolra és a primycinre nézve bizonyult a legérzékenyebbnek. A sztatinok közül szintén a szimvasztatin és a fluvasztatin volt a leghatásosabb.

A MIC értékek megállapítása után elvégeztük az *in vitro* kombinációs vizsgálatokat checkerboard-titrálás segítségével.

A vizsgált *C. parapsilosis* CBS 604 izolátum esetében a grizeofulvin kombinációk egyikében sem tapasztaltunk jelentősebb kölcsönhatásokat. Az itrakonazollal és a ketokonazollal elvégzett vizsgálatok során a két antifungális szer önmagában kifejtett gátló hatása érvényesült, a kombinációk egyikében sem tapasztaltunk antagonista kölcsönhatásokat. A nystatin/sztatin kombinációkban főként semleges kölcsönhatásokat tapasztaltunk, az antifungális szer hatása dominált. A legtöbb együtthatást a terbinafinnal történő kombinációkban figyelhettünk meg, melyek általában az antifungális szer MIC_{50}-érték eléréséhez szükséges koncentrációját egy hígítási lépcsővel csökkentették. Az amfotericin B esetében a legjelentősebb hatásokat az atorvasztatinnal és fluvasztatinnal alkotott kombinációk okozták, míg a flukonazol esetében a fluvasztatin bizonyult a leghatékonyabb interakciós partnernek. A primycin/szatin vizsgálatokban a fluvasztatin és a szimvasztatin bizonyult hatékonynak, míg az atorvasztatinnal elvégzett kombinációkban jelentős antagonizmust figyelhettünk meg.

A *C. guilliermondii* CBS 566 törzs vizsgálata során a legjelentősebb együtthatásokat az itrakonazol/sztatin kombinációkban figyelhettük meg. A szimvasztatin és az atorvasztatin több lépcsővel csökkentette a teljes gátláshoz szükséges itrakonazol-koncentrációt. Az amfotericin B esetében az atorvasztatin, a flukonazol esetében pedig a fluvasztatin bizonyult a leghatékonyabb interakciós partnernek. A nystatin gátló hatása a vizsgált izolátum esetében a *C. parapsilosis*-hoz hasonlóan nem változott jelentősen a kombinációk hatására. A terbinafin hatékonyságát a lovasztatin, szimvasztatin, fluvasztatin és a roszuvasztatin emelte meg jelentősebben, melyek az antifungális szer 50%-os gátláshoz szükséges koncentrációját csökkentették egy hígítási lépcsővel. A primycin esetében jelentős antagonizmust figyeltünk meg a szimvasztatinnal, fluvasztatinnal és atorvasztatinnal elvégzett kombinációk során.

A *C. tropicalis* CBS 94 izolátum felhasználásával elvégzett kombinációs vizsgálatok során számos igen jelentős kölcsönhatást figyeltünk meg. A flukonazol, a ketokonazol és az itrakonazol hatása minden sztatinnal kombinálva megnőtt. Az antifungális szer tejes gátláshoz szükséges koncentrációi több lépcsővel csökkenthetőnek bizonyultak. Egyedül a pravasztatin nem befolyásolta a 100%-os gátláshoz szükséges flukonazol és itrakonazol-koncentrációt, azonban a MIC_{50}-értékek az alacsonyabb koncentrációk felé tolódtak el. Az amfotericin B esetében az atorvasztatin és a roszuvasztatin bizonyult a leghatékonyabb interakciós partnernek. A grizeofulvin hatása a fluvasztatin kombinációkban jelentősen megemelkedett, de a teljes gátlást nem sikerült elérni. A nystatin és a terbinafin gátló hatását a fluvasztatin jelentősen megnövelte. A primycin esetében egyetlen kombinációban sem tapasztaltunk antagonista kölcsönhatásokat. A kölcsönhatások a szimvasztatin esetében egy, a fluvasztatinnal történő kombinációkban három hígítási lépcsővel csökkentették a teljes gátláshoz szükséges primycin-koncentrációt.

A kölcsönhatások vizsgálatai alapján a legtöbb jelentős interakciót a fluvasztatin használatával értük el. A flukonazol hatását *C. parapsilosis* CBS 604 és *C. guilliermondi* CBS 566 esetében a fluvasztatin, az amfotericin B hatását minden vizsgált izolátum esetében az atorvasztatin növelte meg a leginkább. A legkevésbé hatékony interakciós partnereknek a pravasztatin és a lovasztatin bizonyultak.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. Kifejlesztettünk egy PCR alapú kimutatási technikát *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae, C. glabrata, C. albicans*, *C. dubliniensis C. tropicalis, C. parpapsilosis sensu lato és C. kefyr* izolátumok kimutatására.
2. Munkánk során megvizsgáltuk a hazai *C. parapsilosis* izolátumok által kiváltott fertőzések gyakoriságát és genetikai variabilitását. Megbízható molekuláris kimutatási eljárást fejlesztettünk ki *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* izolátumok elkülönítésére
3. Megvizsgáltuk a *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* CBS 138, *C. parapsilosis* CBS 604, *C. guilliermondii* CBS 566 és *C. tropicalis* CBS 94 izolátumok antifungális szerekkel és sztatinokkal szembeni érzékenységét.
4. Checkerboard-titrálás segítségével meghatároztuk az antifungális szerek és a sztatinok közötti interakciókat a vizsgált *Candida* törzsek esetében.

A DOLGOZAT ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

Folyóiratcikkek:

Kocsubé, S., Tóth, M., Vágvölgyi, C., Dóczi, I., Pesti, M., Pócsi, I., Szabó, J., Varga, J. (2007) Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis sensu lato* in Hungary. Journal of Medical Microbiology 56, 190-195. **IF: 2,091**

Nyilasi, I., **Kocsubé, S.**, Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvölgyi, C. (2010b) Effect of different statins on the antifungal activity of polyene antimycotics. Acta Biologica Szegediensis 54, 33-36.

Nyilasi, I., **Kocsubé, S.**, Pesti, M., Lukács, G., Papp, T., Vágvölgyi, C. (2010a) *In vitro* interactions between primycin and different statins in their effects against some clinically important fungi. Journal of Medical Microbiology 59, 200-205. **IF: 2,38**

Szabadalom:

Beszedics, Gy., Vágvölgyi, Cs., **Kocsubé, S.**, Papp, T. (2008): PCR-alapú diagnosztikai eljárás klinikailag fontos *Candida* fajok kimutatására (M.Sz.H. P0800725).

EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

Folyóiratcikkek:

Bereczki, L., Bartha, N., **Kocsubé, S.**, Sóki, J., Lengyel, G., Tálosi, G., Máder, K., Deák J, Dóczi, I. (2012) Fungaemia caused by *Candida pulcherrima*. Medical Mycology 50, 522-524. **IF: 2,457**

Manikandan, P., Varga, J., **Kocsubé, S.**, Anita, R., Revathi, R., Németh, T.M., Narendran, V., Vágvölgyi, C., Paneer Selvam, K., Shobana C.S., Babu Singh Y.R., Kredics, L. (2012) Epidemiology of *Aspergillus* keratitis at a tertiary care eye hospital in South India and antifungal susceptibilities of the causative agents. Mycoses Article in Press, **IF: 2,247**

Nagy, L.G., Házi, J., Szappanos, B., **Kocsubé, S.**, Bálint, B., Rákhely, G., Vágvölgyi, C., Papp, T. (2012) The evolution of defense mechanisms correlate with the explosive diversification of autodigesting *Coprinellus* mushrooms (agaricales, fungi). Systematic Biology 61, 595-607. **IF:10,225**

Szigeti, G., **Kocsubé, S.**, Dóczi, I., Bereczki, L., Vágvölgyi, C., Varga, J. (2012) Molecular identification and antifungal susceptibilities of black *Aspergillus* isolates from otomycosis cases in Hungary. Mycopathologia 174, 143-147. **IF: 1,654**

Szigeti, G., Sedaghati, E., Mahmoudabadi, A.Z., Naseri, A., **Kocsubé, S.**, Vágvölgyi, C., Varga, J. (2011) Species assignment and antifungal susceptibilities of black aspergilli recovered from otomycosis cases in Iran. Mycoses 55, 333-338. **IF: 2,247**

Naeimi, S., **Kocsubé, S.**, Antal, Z., Okhovvat, S., Javan-Nikkhah, M., Vágvölgyi, C., Kredics, L. (2011) Strain-specific SCAR markers for the detection of *Trichoderma harzianum* AS12-2, a biological control agent against *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight. Acta Biologica Hungarica 62, 73-84. **IF: 0,593**

Dobolyi, Cs., Sebők, F., Varga, J., **Kocsubé, S.**, Szigeti, Gy., Baranyi, N., Szécsi, Á., Lustyik, Gy., Micsinai, A., Tóth, B., Varga, M., Kriszt, B., Kukolya, J. (2011): Aflatoxin-termelő *Aspergillus flavus* törzsek előfordulása hazai kukorica szemtermésben. Növényvédelem 47, 125-133.

Sedaghati, E., Nikkhah, M.J., Zare, R., Fotuhifar, K.B., **Kocsubé, S.**, Vágvölgyi, Cs., Varga, J. (2011) Molecular identification of potentialy mycotoxigenic black Aspergili contaminating pistachio nuts in Iran. Acta Alimentaria 40, 65-70. **IF: 0,444**

Varga, J., Frisvad, J.C., **Kocsubé, S.**, Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G., Samson, R.A. (2011) New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. Studies in Mycology 69, 1-17. **IF: 10,625**

Varga, J., **Kocsubé, S.**, Tóth, B., Bartók, T. (2011) Response to letter to the editor on 'Fumonisin contamination and fumonisin producing black Aspergilli in dried vine fruits of different origin published in International Journal of Food Microbiology, 143, 143-149. International Journal of Food Microbiology 152, 46-48. **IF: 3,327**

Manikandan, P., Varga, J., **Kocsubé, S.**, Revathi, R., Anita, R., Dóczi, I., Németh, T.M., Narendran, V., Vágvölgyi, C., Bhaskar, M., Manoharan, C., Samson, R.A., Kredics, L. (2010) Keratitis caused by the recently described new species *Aspergillus brasiliensis*: Two case reports. Journal of Medical Case Reports 24;4:68

Nyilasi, I., **Kocsubé, S.**, Krizsán, K., Galgóczy, L., Pesti, M., Papp, T., Vágvölgyi, C. (2010c) *In vitro* synergistic interactions of the effects of various statins and azoles against some clinically important fungi. FEMS Microbiology Letters 307, 175-184. **IF: 2,04**

Varga, J., **Kocsubé, S.**, Péteri, Z., Vágvölgyi, C., Tóth, B. (2010): Chemical, physical and biological approaches to prevent ochratoxin induced toxicoses in humans and animals. Toxins (Basel). 2, 1718-50.

Varga, J., **Kocsubé, S.**, Suri, K., Szigeti, G., Szekeres, A., Varga, M., Tóth, B., Bartók, T. (2010) Fumonisin contamination and fumonisin producing black Aspergilli in dried vine fruits of different origin. International Journal of Food Microbiology 143, 143-149. **IF: 3,143**

Nagy, L.G., **Kocsubé, S.**, Papp, T., Vágvölgyi, C. (2009) Phylogeny and character evolution of the coprinoid mushroom genus *Parasola* as inferred from LSU and ITS nrDNA sequence data. Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi 22, 28-37.

Malinovschi, G., **Kocsubé, S.**, Galgóczy, L., Somogyvári, F., Vágvölgyi, C. (2009) Rapid PCR based identification of two medically important dermatophyte fungi, *Microsporum canis* and *Trichophyton tonsurans.* Acta Biologica Szegediensis 53, 51-54.

Manikandan, P., Varga, J., **Kocsubé, S.**, Samson, R.A., Anita, R., Revathi, R., Dóczi, I., Németh, T.M., Narendran, V., Vágvölgyi, C., Manoharan, C., Kredics, L. (2009) Mycotic keratitis due to *Aspergillus nomius.* Journal of Clinical Microbiology 47, 3382-3385. **IF: 4,162**

Kredics, L., Varga, J., **Kocsubé, S.**, Rajaraman, R., Raghavan, A., Dóczi, I., Bhaskar, M., Németh, T.M., Antal, Z., Venkatapathy, N., Vágvölgyi, C., Samson, R.A., Chockaiya, M., Palanisamy, M. (2009) Infectious keratitis caused by *Aspergillus tubingensis Cornea* 28, 951-954. **IF: 2,106**

Kredics, L., **Kocsubé, S.**, Nagy, L., Komoń-Zelazowska, M., Manczinger, L., Sajben, E., Nagy, A., Vágvölgyi, C., Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S., Hatvani, L. (2009) Molecular identification of *Trichoderma species* associated with *Pleurotus ostreatus* and natural substrates of the oyster mushroom. FEMS Microbiology Letters 300, 58-67. **IF: 2,199**

Kredics, L., Cseh, T., Körmöczi, P., Nagy, A., **Kocsubé, S.**, Manczinger, L., Vágvölgyi, C., Hatvani, L. (2009) A termesztett laskagomba zöldpenészes fertőzése. Mikológia Közlemények Clusiana 48, 81-92.

Perrone, G., Varga, J., Susca, A., Frisvad, J.C., Stea, G., **Kocsubé, S.**, Tóth, B., Kozakiewicz, Z., Samson, R.A. (2008) *Aspergillus uvarum* sp. nov., an uniseriate black *Aspergillus* species isolated from grapes in Europe. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58, 1032-1039. **IF: 1,463**

Kredics, L., Varga, J., Antal, Z., Samson, R.A., **Kocsubé, S.**, Narendran, V., Bhaskar, M., Manoharan, C., Vágvölgyi, C., Manikandan, P. (2008) Black aspergilli in tropical infections. Reviews in Medical Microbiology 19, 65-78. **IF: 0,75**

Farkas, Z., **Kocsubé, S.**, Tóth, M., Vágvölgyi, C., Kucsera, J., Varga, J., Pfeiffer, I. (2008) Genetic variability of *Candida albicans* isolates in a university hospital in Hungary. Mycoses 52, 318-325. **IF: 1,529**

Kredics, L., Varga, J., **Kocsubé, S.**, Dóczi, I., Samson, R.A., Rajaraman, R., Narendran, V., Bhaskar, M., Vágvölgyi, C., Manikandan, P. (2007) Case of keratitis caused by *Aspergillus tamarii.* Journal of Clinical Microbiology 45, 3464-3467. **IF:3,708**

Varga, J., **Kocsubé, S.**, Tóth, B., Frisvad, J.C., Perrone, G., Susca, A., Meijer, M., Samson, R.A. (2007) *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57, 1925-1932. **IF: 2,384**

Varga, J., Koncz, Z., **Kocsubé, S.**, Mátrai, T., Téren, J., Ostry, V., Skarkova, J., Ruprich, J., Kubatova, A., Kozakiewicz, Z. (2007) Mycobiota of grapes collected in Hungarian and Czech vineyards in 2004. Acta Alimentaria 36, 329-341. **IF: 0,398**

Varga, J., **Kocsubé, S.**, Koncz, Z., Téren, J. (2006) Mycobiota and ochratoxin A in raisins purchased in Hungary. Acta Alimentaria 35, 289-294. **IF: 0.253**

Varga, J., **Kocsubé, S.**, Tóth, B., Mesterházy, Á. (2005) Nonribosomal peptide synthetase genes in the genome of *Fusarium graminearum*, causative agent of wheat head blight. Acta Biologica Hungarica 56, 375-388. **IF: 0,636**

Varga, J., Tóth, B., **Kocsubé, S.**, Farkas, B., Szakács, G., Téren, J., Kozakiewicz, Z. (2005) Evolutionary relationships among *Aspergillus terreus* isolates and their relatives. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology 88, 141-150. **IF: 1,483**

Varga, J., Rigó, K., **Kocsubé, S.**, Farkas, B., Pál, K. (2003) Diversity of polyketide synthase gene sequences in *Aspergillus* species. Research in Microbiology 154, 593-600. **IF: 2,257**

Könyvfejezetek:

Varga, J., **Kocsubé, S.,** Péteri, Z., Samson, R.A. (2009) An overview of ochratoxin research. In: Rai, M., Bridge, P. (Eds.) Applied Mycology, CABI Publishers, London, UK 38–55.

Manikandan, P., Dóczi, I., **Kocsubé, S.**, Varga, J., Németh, T.M., Antal, Z., Vágvölgyi, C., Bhaskar, M, Kredics, L. (2008) Aspergillus species in human keratomycosis. In: Varga, J., Samson, R.A. (Eds.) Aspergillus in the genomic era, Wageningen Academic Publishers, 293-328.

Kredics, L., **Kocsubé, S.**, Antal, Zs., Hatvani, L., Manczinger, L., Vágvölgyi, Cs. (2009) Extracellular proteases of mycoparasitic and nematophagous fungi. In: Rai, M., Bridge, P. (Eds.) Applied Mycology, CAB International, Wallingford, 290-307.

Varga, J., Rigó, K**., Kocsubé, S.**, Pál, K., Tóth, B., Samson, R.A., Kozakiewicz, Z. (2006) Evolutionary relationships among economically important species of Aspergillus subgenera *Aspergillus* and *Fumigati*. In: Sharma, A.K., Sharma, A. (Eds.) Plant genome: diversity and evolution Vol 2B. Cryptogams. Enfield: Science Publishers, Inc., 285-332.

Hatvani, L., Kredics, L., **Kocsubé, S.**, Manczinger, L., Vágvölgyi, C., Antal, Zs. (2010) Extracellular proteases of entomopathogenic fungi. In: Fuchs, S., Auer, M. (Eds.) Biochemistry and Histocytochemistry Research Developments. Nova Science Publishers Inc., New York, 273-297.

Manikandan, P., Galgóczy, L., Panneer Selvam, K., Shobana, S., **Kocsubé, S.**, Vágvölgyi, C., Narendran, V., Kredics, L. (2011) Chapter 51. Fusarium In: Liu, D. (Ed.) Molecular detection of human fungal pathogens London: Taylor & Francis Group, 417-433.

Tankönyv:

Varga, J., Téren, J., Tóth, B., Kocsubé, S., Rigó, K. (2009) Gombák másodlagos anyagcseretermékei: mikotoxinok, gombamérgek JATEPress, 2009

Összesített impakt faktor: 66,801