

37. OTDK Biológia Szekció

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIA INTÉZET

MINIMÁLIS GÁTLÓKONCENTRÁCIÓ MEGHATÁROZÁSRA ALKALMAS MÓDSZEREK ÖSSZEHAONLÍTÓ VIZSGÁLATA *ASPERGILLUS* FAJOK ESETÉBEN



Témavezetők: Dr. Czéh Árpád
Makkai Enikő
Alkalmazott Molekuláris Tudományok
Külső Tanszék

Készítette: Salamon Bettina Kitti
(F3EPMY)
Biológus MSc II. évfolyam

PÉCS, 2025

Tartalomjegyzék

I. ABSZTRAKT	4
II. BEVEZETÉS.....	5
II.1. Miért fontos a mikotoxin termelő gombákkal foglalkozni?	5
II.2. A mikotoxinokról általánosan	8
II.3. <i>Aspergillus</i> nemzetség	9
II.3.1. <i>Aspergillus flavus</i>	10
II.3.2. <i>Aspergillus parasiticus</i>	11
II.4. Antimikrobiális érzékenység	13
II.4.1. <i>Azolo</i> k	13
II.4.2. <i>Metkonazol</i> és <i>vorikonazol</i>	14
III. CÉLKITŰZÉSEK	15
IV. ANYAG ÉS MÓDSZERTAN	17
IV.1. Gombatorzsek eltávolítása	17
IV.2. Agar hígítási módszer	17
IV.2.1. <i>Táptalaj</i>	17
IV.2.2. <i>Gombaellenes szerek</i>	17
IV.2.3. <i>Törzstenyészetek</i>	18
IV.2.4. <i>Kísérlet összeállítása</i>	18
IV.2.5. <i>Eredmények feldolgozása</i>	19
IV.3. CLSI mikrodilúciós protokoll	19
IV.3.1. <i>Táptalaj</i>	20
IV.3.2. <i>Gombaellenes szerek</i>	20
IV.3.3. <i>Törzstenyészetek</i>	20
IV.3.4. <i>Kísérlet összeállítása</i>	21
IV.3.5. <i>Eredmények feldolgozása</i>	21
IV.4. Összehasonlíthatóság	22
V. EREDMÉNYEK	23
V.1. MIC (minimum inhibitory concentration) megállapítása <i>Aspergillus flavus</i> és <i>Aspergillus parasiticus</i> esetében	23
V.2. Agar hígítási és CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) mikrodilúciós technika összehasonlítása <i>Aspergillus</i> fajok esetében	23
V.2.1. <i>Agar hígítási technika</i>	24
V.2.2. <i>CLSI mikrodilúciós technika</i>	25

V.3. A klinikumban (vorikonazol) és agráriumban (metkonazol) használatos antifungális szerek összehasonlítása	25
VI. DISZKUSSZIÓ	31
VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	34
VIII. FORRÁSOK.....	35

I. ABSZTRAKT

A mikotoxin termelő gombák komoly veszélyt jelentenek az emberekre, az állatokra és a növényekre egyaránt, valamint súlyos globális problémákat okoznak a mezőgazdaságban, az élelmiszeriparban és az egészségügyben is. Az *Aspergillus* nemzetség több mint 340 hivatalosan elfogadott fonalas gombafajt foglal magában, amelyek a Földön a leggyakoribb és legelterjedtebb gombák közé tartoznak. A vizsgálataink középpontjában két faj, az *Aspergillus flavus* és az *Aspergillus parasiticus* állt. Mindkét csoport jelentős szerepet játszik az egyik legveszélyesebb mikotoxin, a karcinogén aflatoxin termelésében. A klímaváltozás következtében Európa több országában megjelentek aflatoxinogén *Aspergillus* fajok, többek között Magyarországon is, emiatt különösen fontos a fertőzések detektálása és a mielőbbi válaszlépés. Az infekció elleni védelem és kezelés során fontos megállapítani milyen dózisban alkalmazzunk egy adott fungicid vegyületet, minimálisra csökkentve a rezisztencia vagy a súlyos mellékhatások kialakulását. A megfelelő gombaellenes szer alkalmazási mennyiség megtalálásával a végső cél a toxintermelés gátlása, ezen keresztül a komplett toxinszint csökkentése. Ennek okán a céloom kettő a gyakorlatban is alkalmazott minimális gátló koncentráció meghatározására alkalmazott módszer összehasonlító vizsgálata (agar hígításos és CLSI mikrodilúciós technika) volt, két olyan gombaellenes szer esetében, amelyek közül az egyik a mezőgazdasági (metkonazol), a másik a klinikai (vorikonazol) gyakorlatban kerül alkalmazásra. A két protokoll összehasonlításából eredő előnyök és hátrányok figyelembevételével a későbbiekben egy egységes, jól reprezentálható hibrid eljárás kidolgozását tervezzük, amely beépíthető a kutatási, valamint a mezőgazdasági gyakorlatba is. Egy szabványosított módszer kidolgozása érdekében bevonásra kerülnének a későbbiekben további *Aspergillus* fajok is.

A CLSI mikrodilúciós technika egy alacsonyabb koncentráció értékeket mutató eljárás, könnyen reprodukálható eredményekkel, azonban a keverék heterogenitása miatt a műszer gyakran detektál kiugró értékeket, ha egy denzebb micéliumhálózatot ér a fénynyaláb. Az agar hígításos módszer egy durvább technika, amelyben nagyobb eséllyel történik emberi hiba, azonban összességében egységesebb gátló koncentráció értékeket mutatott. Ez utóbbit egy nem szakképzett személy is viszonylag egyszerűen végre tudja hajtani, valamint láthatóak az antimikotikumokra adott morfológiai változások is.

II. BEVEZETÉS

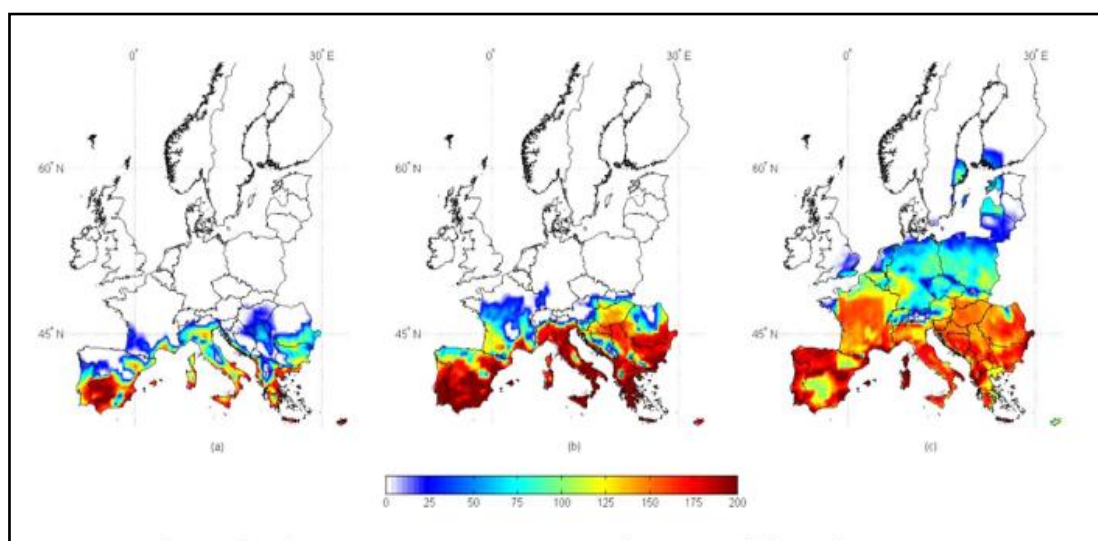
II.1. Miért fontos a mikotoxin termelő gombákkal foglalkozni?

A mikotoxinok az alacsony molekulatömegű toxikus másodlagos metabolitok viszonylag nagy és kémiaiilag változatos csoportját alkotják. Jellemzően az *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* és *Fusarium* nemzetségbe tartozó fonalas gombák felelősek a termelésükért. Az 1960-as években kezdődött a mikotoxinok iránti érdeklődés, amely mára világszintű kutatásokká nőtte ki magát. A mikotoxinok számos szervre és szervrendszerre káros hatással lehetnek, például a májra, a vesére, az immunrendszerre, a szaporodási és fejlődési rendszerre egyaránt, emellett genotoxikus és karcinogén tulajdonságaikkal rákos megbetegedéshez is vezethetnek. A szervezetben történő egészségkárosító hatásai sokszor az egyén állapotától függenek, például az immunszuppresszált, kemoterápia vagy antibakteriális kezelés alatt álló személyek esetében nagyobb a kockázata a toxikus hatásnak (Ülger és mtsai. 2020).

Globális mezőgazdasági, agráripari és egészségügyi kockázatokat is jelentenek, ugyanis a mikotoxinok olyan élelmiszer szennyezők, amelyek akkor fordulnak elő, ha a toxikus gombák kolonizálják a termést. Sajnálatos módon a kukorica, amely világszerte egyike a fő élelmiszeripari növényeknek, nagyon érzékeny a mikotoxin szennyeződésre (Wu 2022). A gabonafélék és a különböző típusú diófélék, valamint az azokból készült termékek jelentik a fő expozíciós forrásokat. A kukorica, a földimogyoró, a rizs, a cirok és a búza mindegyike több mint 10%-kal járul hozzá az aflatoxinoknak való globális kitettséghez (Eskola és mtsai. 2019). Az Egyesült Államokban az Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hatóság 20 µg/kg-ban határozta meg az emberi élelmiszerekben megengedhető aflatoxin mennyiséget. Bár ez az intézkedési szint biztosítja az élelmiszerbiztonságot a fogyasztók számára, gazdasági veszteséget is jelent a termelőknek, ha a kukoricájuk túllépi ezt a határértéket. Ezután vagy árengedménnyel adják el állati takarmánnyként, vagy teljes veszteséget produkálva, élelmiszerhulladékként kidobják. A kidobott élelmiszer mennyisége problémát jelentett az olyan években, mint például 2012, amikor a forró és száraz nyarak megnövelték az aflatoxin kockázatát a kukoricaövezetben, valamint fontos megemlíteni, hogy a klímaváltozás miatt várhatóan nőni fog az ilyen nyarak gyakorisága (Wu 2022). Magyarországon (és az Európai Unióban) a megengedett maximális mennyiségek az EU-s élelmiszerbiztonsági előírásokban találhatóak meg. A felső határérték (µg/kg) az aflatoxin és az élelmiszer típusától függően változó, például a „a végső fogyasztók számára vagy élelmiszer-összetevőként való felhasználás céljára történő forgalomba hozatal előtt válogatásnak vagy más fizikai kezelésnek alávetendő kukorica és rizs” aflatoxin B1 felső

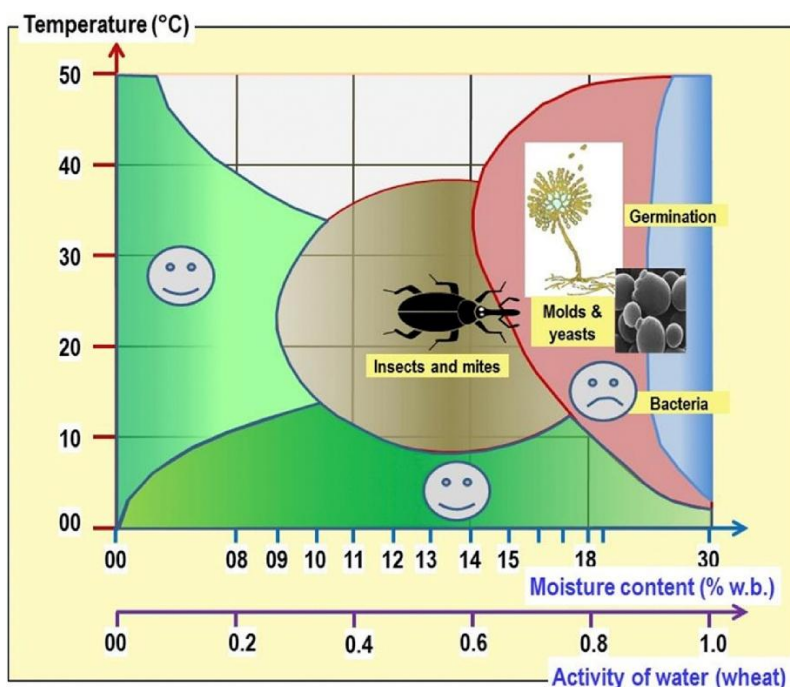
határértéke 5 µg/kg. Az aflatoxin esetében kiemelendő, hogy nem csak a humán élelmiszer, de az állati takarmányok esetében is van meghatározott felső határérték (European Union, 2023). Már léteznek különböző megelőző és kezelő eljárások a gombafertőzések mérséklésére, azonban elengedhetetlen a potenciálisan új mechanizmusok azonosítása a gabonákat fogyasztó emberek és háziállatok biztonságának megőrzéséhez. Súlyosabb fertőzések esetén nem feltétlen elegendőek a meglévő kezelési eljárások, a gombafertőzés csökkentése nem mindig elégséges ahhoz, hogy a mikotoxin mennyiség a szabályozási határértékek alá essen. Emiatt fontos, hogy a 21. században a toxinszennyezés kezelésének eredményeit kritikus szemmel kísérjék, és olyan célokat kell meghatározni, amelyek a mikotoxin szennyezés jelentős csökkenéséhez vezethetnek a jövőben (Leslie és mtsai. 2021).

Magyarországon is az egyik fő gazdasági haszonnövény a kukorica, amely, mint már említve lett viszonylag érzékeny a mikotoxin szennyezésre. 2012 és 2017 között zajlott Magyarországon összesen 17 011 kukoricaminta mikotoxin tartalmának a vizsgálta. Az eredmények egyértelműen azt mutatták, hogy az ország déli területein az átlagosnál magasabb volt a toxinszennyezettség, az aflatoxin jelenléte rendszeressé vált, valamint a fumonizinek megjelenése is egyre gyakoribb lett. A hatéves nemzeti adatállomány egyértelműen azt mutatta, hogy az összes főbb mikotoxin megtalálható a kukoricában. Az ország déli, a román, a szerb és a horvát határ menti megyéi szignifikánsan magasabb toxinszennyezettséget mutattak, mint az észak-magyarországi megyék. Az adatok alátámasztották, hogy az aflatoxin termelése már a szántóföldön is elkezdődhet, továbbá az előfordulása a klímaváltozás hatására egyre hangsúlyosabb lesz (Mesterházy és mtsai. 2022).



1. ábra: A kukorica aflatoxin szennyezettségének kockázati térképei betakarításkor 3 különböző éghajlati forgatókönyv esetén, jelenlegi (a), +2 °C (b) és +5 °C (c). A 0-200-as skála az aflatoxin kockázati indexre (AFI) utal (Battilani és mtsai. 2016)

Az időjárás és a mikotoxinogén gombák fertőző képessége között szoros összefüggés figyelhető meg. Az aflatoxin az *Aspergillus* nemzetség egyes fajainak rendkívül veszélyes, karcinogén hatással rendelkező másodlagos anyagcsereterméke. Jelenléte két különálló fázisra osztható, az első fázisban a fejlődő termés fertőzése, a második fázisban pedig az érés utáni szennyezettség növekedése zajlik. A fertőzés első fázisában a fejlődő termés mechanikai sérülést szenvedhet különböző állatok, emlősök, madarak vagy rovarok által, emellett az időjárás miatti, például jégeső vagy a forró, száraz körülmények okozta sérülések is jelentős fertőzésekhez vezethetnek. A szennyeződés második fázisa a termés érésétől a fogyasztásig bármikor bekövetkezhet. Ebben a fázisban a toxin mennyisége mind az első fázisban fertőzött, mind az érés után fertőzött komponensekben megnő. Ez akkor következik be, amikor a kifejlett termést meleg, nedves, azaz a gombák számára ideális körülményeknek teszik ki akár a szántóföldön, akár a szállítás és tárolás, illetve a felhasználás során (például az etetőtelep padlóján). A védekezés egyik módja a gombák számára legkevésbé ideális körülmények közötti érlelés, betakarítás és tárolás. Tehát az éghajlat és az időjárási viszonyok fontos befolyásoló tényezők a gombák növekedése és toxin termelése szempontjából, emellett azt is befolyásolják, hogy az emlősök, madarak és rovarok milyen mértékben sértik meg a termést. A rovarok esetében az évszakok közötti túlélést, a régiók közötti szétszóródást és a populáció növekedésének ütemét is befolyásolja, ezzel közvetetten a növények fertőzését is, ugyanis bizonyos rovarok lehetnek a gombák terjedésének vektor szervezetei (Cotty és Jaime-Garcia 2007).

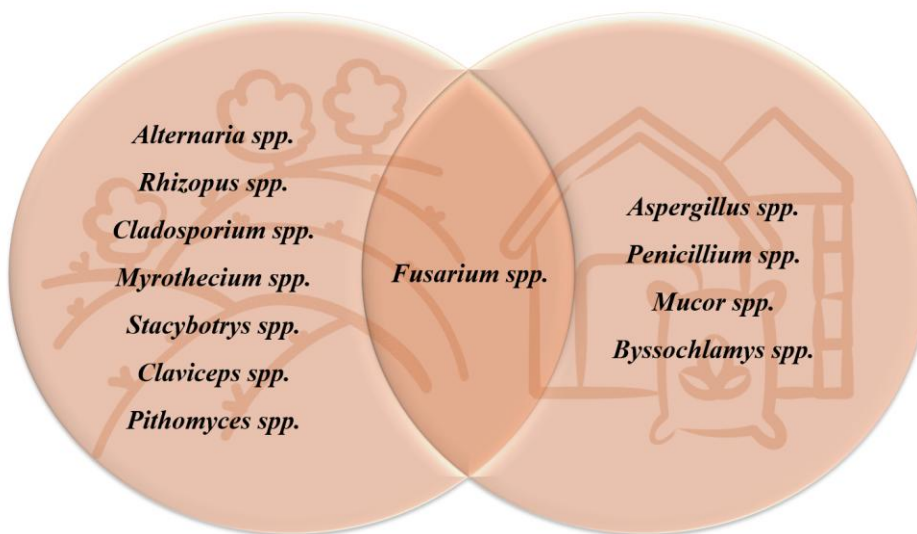


2. ábra: A tárolt gabona romlásának biológiai vagy biokémiai okai a főbb biológiai romlási tényezők fizikai-kémiai állapotathatárai szerint (Fleurat-Lessard 2017)

II.2. A mikotoxinokról általánosan

A „mikotoxin” szó a „myco” és a „toxin” szavakból származik, amelyek a görög „mykes” és „toxikon” szavakból erednek, jelentése olyan „penész”, illetve „mérge”, amelyet egy élő szervezet termel. A gombák, ha van megfelelő hőmérséklet, páratartalom, elegendő tápanyag, valamint, ha a gombatömeg sűrűsége is kedvező, akkor mikotoxinokat termelnek. Bár minden mikotoxin gombás eredetű, a gombák által termelt összes mérgező vegyületet nem nevezzük mikotoxinnak (Ülger és mtsai. 2020). A mikotoxinok nem nélkülözhetetlenek a gombák normális növekedéséhez és szaporodásához, de képesek számos fajban biokémiai, fiziológiai és kóros elváltozásokat okozni. Bioszintézisük meghatározott mikroklimatikus körülmények között megy végbe, elsősorban a szubsztrát nedvességtartalmától, vízáktivitásától, a levegő relatív páratartalmától, hőmérsékletétől, pH-értéktől, a táplálékmátrix összetételétől, fizikai károsodásának mértékétől és a penészgombák jelenlététől függően. A látható penészgombák hiánya az élelmiszerekben és takarmányokban nem feltétlenül jelenti azt, hogy az élelmiszer vagy takarmány mikotoxin mentes. Az emberi szervezetbe való bejutásának legáltalánosabb módja a szennyezett növényi eredetű termékek közvetlen fogyasztása, de ezek a vegyületek közvetett módon is bejuthatnak a szervezetbe az állati eredetű táplálék fogyasztásából adódóan. Rendkívül stabil vegyületek, ellenállnak a különféle élelmiszer- és takarmánygyártási, feldolgozási és tárolási környezeteknek, tehát ha egyszer megtermelődtek, akkor szinte lehetetlen az eltávolításuk. Annak ellenére, hogy több száz mikotoxinként osztályozott vegyületet izoláltak és kémiaiailag jellemeztek, közülük csak nagyjából 50-et vizsgáltak meg részletesen. Kémiai összetétel és toxicitás szempontjából is rendkívül heterogének. Kémiai szerkezetük, biokémiai szintézisük útjai, eredetük, valamint az emberekre és állatokra gyakorolt biológiai hatásuk különbségei gyakorlatilag lehetetlenné teszik egyedi rendszerezésüket. A legjelentősebb mikotoxin képviselők az aflatoxin B1, ochratoxin A, deoxinivalenol, HT-2 és T-2 toxinok, zearalenon, fumonizin B1, citrinin, patulin és ergotamin. A nemzetség alapú osztályozás viszonylag gyakori, főbb mikotoxintermelő gombanemzetségek a *Fusarium*, az *Aspergillus* és a *Penicillium*, de a *Cladosporium*, a *Claviceps*, az *Alternaria* és a *Helminthosporium* is ide tartozhatnak. Toxicitásuk alapján is létezik csoportosítás, ahol a fő szempont a milligrammos mennyiség a testtömeg kilogrammhoz képest. Az első csoportba tartoznak a súlyosan mérgező mikotoxinok, mint például a cikloklorotin és a rubratoxin B, amelyek halálosak még akkor is, ha 1 mg/ttkg-nál kisebb mennyiségben vannak jelen. A második csoport erősen mérgező mikotoxinokból, például aflatoxin B1-ből, trichotecénekből és citreoviridinből áll, amelyek halálosak, ha 1 és 10 mg/ttkg közötti mennyiségben vannak

jelen. A harmadik csoportba tartozik minden egyéb toxikus metabolit, amely halálos, ha 10 mg/ttkg-nál nagyobb mennyiségben van jelen. A legkárosabb fajok a xerofil osztályba tartozóak, ilyenek az *Aspergillus* és a *Penicillium* nemzetség egyes fajtái (Fleurat-Lessard 2017). A mikotoxin-termelő penészgombák általában növényi és állati eredetű szubsztrátumokon nőnek, és leginkább olyan régiókban fordulnak elő, amelyeket állandóan magas relatív páratartalom és mérsékelt vagy magas hőmérséklet jellemez. A gabonafélék mikroflórája három csoportra osztható: első a természetes élőhelyeken élő penészgombák, azaz azok, amelyek a betakarítás előtt már a szántóföldön lévő gabonaszemekben nőnek. Ezek a formák elsősorban az *Alternaria*, *Fusarium*, *Rhizopus* és *Cladosporium* nemzetségekhez tartoznak. Második a tárolt gabonaféléken növő penészgombák, amelyek többnyire a betakarítás utáni tárolás során találhatók a szemeken. Ez utóbbi főként a *Penicillium*, az *Aspergillus* és a *Mucor* nemzetségekhez tartozik. Harmadik csoport a fejlett romlást okozó penészgombák, amelyek más mikroorganizmusok által már károsított növényeken jelennek meg. Ez a csoport elsősorban a *Fusarium* és *Chaetomium* nemzetségekhez tartozó formákat foglalja magában (Pleadin és mtsai. 2019).



3. ábra: Bal oldalon a szántóföldi penészek, jobb oldalon a raktári penészek (saját ábra)

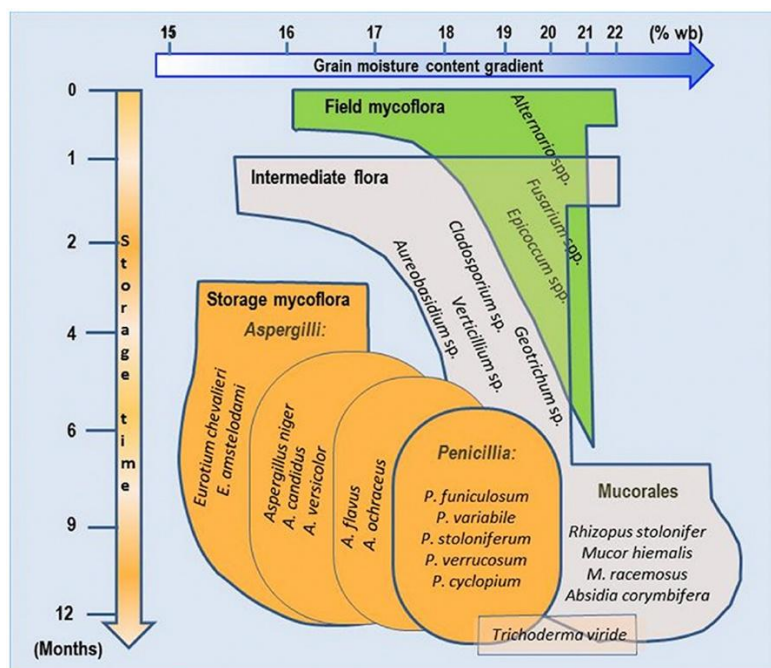
II.3. *Aspergillus* nemzetség

A fonalgombák közé tartozó *Aspergillus*-ok az *Eurotilaes* rendbe tartozó tömlősgombák. Az *Aspergillus* nemzetség az egyik legelterjedtebb gombacsoport a Földön, körülbelül 300-350 fajtából áll, nagyon változatos életmóddal. A legtöbb faj ivartalan szaporítóanyagot (konídiumokat) termel a konídium fejeken. Mindenhol jelen vannak a környezetünkben, így a

vele való találkozás elkerülhetetlen. Általában a talajban és a bomló növényi anyagokban találhatóak meg, és számos proteolitikus enzimet választanak ki a táplálékforrások lebontására. A csapadék, a páratartalom és a hőmérséklet regionális különbségei vélhetően szerepet játszanak az *Aspergillus* nemzetség környezeti gyakoriságában és faji eloszlásában. A fertőzések többségét az *A. fumigatus* csoportja okozza, amelyet az *A. flavus*, az *A. niger* és az *A. terreus* követ. További fajok is előfordulhatnak, különösen a legyengült immunrendszerű betegeknél. A klinikai gyakorlatban nem azonosítják rutinszerűen az izolátumokat faji szintig, amely megnehezítheti a pontos kezelést. Az aszpergillózis a leggyakoribb gombás fertőzés a vérképző őssejttranszplantáción átesett betegek körében. Az aszpergillózis a betegségek olyan spektrumára utal, amely a gazdaszervezet különböző tényezőitől, az immunológiai választól függ. A nem invazív formák közé tartozik az allergiás bronchopulmonális aszpergillózis és az allergiás gombás rhinosinusitis, míg az invazívabb betegségek közé tartozik a krónikus tüdő aszpergillózis és az invazív tüdő aszpergillózis (Cadena és mtsai. 2021).

II.3.1. *Aspergillus flavus*

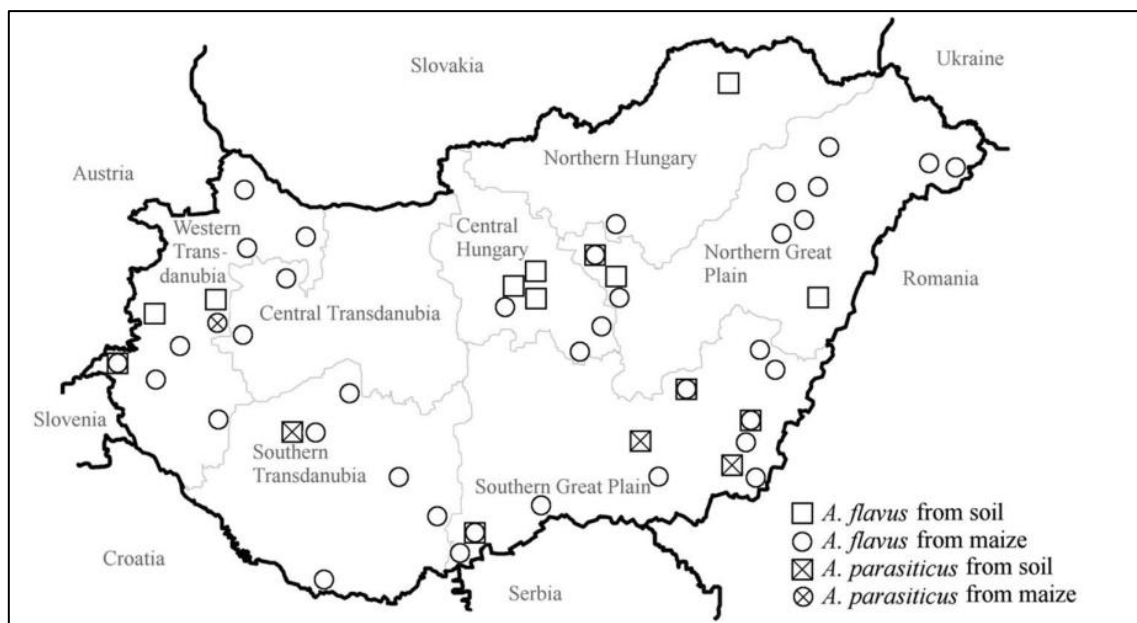
Az *A. flavus* az emberi megbetegedések széles spektrumának okozója, elsősorban Ázsiában, a Közel-Keleten és Afrikában, feltehetően azért, mert a többi *Aspergillus spp.*-hez képest jobban tud túlélni a meleg és száraz éghajlati körülmények között. Világszerte a bronchopulmonális aszpergillózis eseteinek körülbelül 10%-át az *A. flavus* okozza. Kísérleti in vivo vizsgálatok kimutatták, hogy az *A. flavus* virulensebb, mint az *A. fumigatus* és más *Aspergillus*-ok mind a normál, mind az immunhiányos kísérleti egerek mortalitásának előidézéséhez szükséges idő és kezdeti inokulum tekintetében. A világ tíz legrettegettebb gombája közül az *A. flavus* azért került az ötödik helyre, mert az emberi megbetegedések mellett számos kultúrnövényben a betakarítás előtti és utáni megbetegedések, valamint az aflatoxinnal összefüggő toxicitást okoz emberekben és állatokban egyaránt. Növekedési hőmérséklete 12 és 48 °C között változik (Rudramurthy és mtsai. 2019). Különböző biomák (erdő, gyepek, vizes élőhelyek és sivatag) talajából izolálták, azonban azt találták, hogy a művelt talajok nagyobb arányban tartalmazzák az *A. flavus*-t, mint a természetes élőhelyek.



4. ábra: A tárolt kukoricaszemeket fertőző fő gombafajok szukcessziós mintázata hosszabb tárolási idő alatt (Fleurat-Lessard 2017)

II.3.2. *Aspergillus parasiticus*

Sebők és munkatárai (2016) munkája során magyarországi kukoricatáblákról izolált törzsek 96%-a az *A. flavus*, a többi 4 %-a pedig az *A. parasiticus* fajhoz tartozott. Ezek az eredmények összhangban vannak egy korábbi munkával, amely a 2003–2004-ben Észak-Olaszországban izolált *Aspergillus* szakasz *Flavi* törzseit vizsgálta. Az *A. parasiticus* jelenlétét évtizedek óta jelentették több országban, különösen Amerikában és Ázsiában. A közelmúltban Szlovákiában a búzában, Horvátországban pedig beltéri levegőben mutatták ki. Az *A. parasiticus* kukoricában való megjelenését illetően azonban ez volt az első adat Közép-Európából. Az *A. parasiticus* törzsek több, mint 90%-a aflatoxin termelőként ismert, és mind a négy magyarországi törzs aflatoxigén hatásának bizonyult a kutatásban, így e faj előfordulása a kukorica aflatoxin szennyeződésének kockázatával fenyegeti az országot.



5. ábra: Az aflatoxin termelő *Aspergillus* törzsek megoszlása Magyarországon 2013 és 2014 között
(Sebők és munkatárai 2016)

Az *A. parasiticus* az *A. flavus*-hoz hasonlóan képes aflatoxin B1, B2, G1 és G2 termelésére is, tehát a tartós megjelenése súlyos következményekkel járhat. Amint a fentebb említett tanulmányból is látszik egyelőre Magyarországon még viszonylag alacsony mértékben van jelen, azonban a klímaváltozás miatt ez előreláthatólag változni fog. Összességében Európában az *A. parasiticus* kukoricában való előfordulása aránylag ritka volt, ez annak köszönhető, hogy magas hőmérséklet és relatív páratartalom, valamint különösen magas éjszakai hőmérséklet szükséges a megjelenéséhez és intenzív fejlődéséhez szabadföldi körülmények között. Érdeemes kitekintést tenni a szomszédos országokra is, Szerbiában az *A. parasiticus*-t elsőként kukoricaszemekből izolálták szántóföldi körülmények között a 2012-es tenyészidőszakban. A 2012-es vegetációs időszakban megfigyelt nagyon magas hőmérséklet és extrém hosszan tartó szárazság nagyon alacsony csapadéktényezőt (0,27-1,45) és száraz körülményeket eredményezett. Ezt követően az évi középhőmérséklet meghaladta a 12 °C-ot, ezért az *Aspergillus* fajok szerte Szerbiában megjelentek a szántóföldeken, ellentétben a korábbi évekkel, amikor ezeket a fajokat csak a tárolás során azonosították. Ez volt az első előfordulása a szerb éghajlati viszonyok között termesztett kukoricából, búzából és árpaszemből nyert *A. parasiticus* izolátumoknak (Nikolić és mtsai. 2021).

II.4. Antimikrobiális érzékenység

Az elmúlt években egyre nagyobb érdeklődés mutatkozott a különböző forrásokból származó új antimikrobiális szerek kutatása és kifejlesztése iránt a mikroba növekedése, fertőzés kialakulása, valamint a mikrobiális rezisztencia leküzdése érdekében. Emiatt egyre nagyobb figyelmet fordítanak az antimikrobiális aktivitás detektálására és értékelésére. Számos biológiai vizsgálati módszer létezik már, mint például a korong diffúzió, a húsleves vagy agar hígítás, ezek jól ismert és általánosan használt eljárások. Más technikákat, például az áramlási citometriás és biolumineszcens módszereket nem alkalmazzák széles körben, mert meghatározott berendezéseket és további értékelést igényelnek a reprodukálhatóság és szabványosítás érdekében. Az antimikrobiális érzékenységi vizsgálatok felhasználhatóak gyógyszerkutatásra, epidemiológiára és a terápia kimenetel előrejelzésére.

Az új antibiotikumok felfedezése kiemelten fontos cél. A természetes termékek ma is az új gyógyszermolekulák egyik fő forrását jelentik. Prokarióta baktériumokból, eukarióta mikroorganizmusokból, növényekből és különféle állati szervezetekből származnak. Az eddig felfedezett antimikrobiális vegyületek nagy részét a mikrobiális és növényi termékek teszik ki. A növények és más természetes források komplex és szerkezetileg változatos vegyületek hatalmas skáláját biztosítják, ezek összehasonlítása gyakran nehézkes, mivel a kutatók sokszor különböző, nem szabványosított megközelítéseket alkalmaznak. Különféle laboratóriumi módszerek használhatók egy kivonat vagy egy tiszta vegyület in vitro antimikrobiális aktivitásának értékelésére vagy szűrésére. Fontos, hogy minél jobban megértsük egy vegyület antimikrobiális hatását, az eredményeket lehessen kvantifikálni, és beültetni az egészségügyi, mezőgazdasági és környezetvédelmi gyakorlatba is (Balouiri és mtsai. 2016). A mesterséges vegyületek előnye, hogy ismerjük a pontos összetételt, és ebből adódóan pontosabb információk állnak a rendelkezésre milyen hatásmechanizmuson keresztül képesek gátolni az adott mikroorganizmust.

II.4.1. Azolok

Az azol típusú gombaellenes szerek élvonalbeli kezelési lehetőséget nyújtanak az invazív gombás fertőzések megelőzésében és kezelésében. Gyakran hosszabb ideig (hetektől hónapokig) alkalmazzák őket, különösen rosszindulatú hematológiai betegségekben szenvedő pácienseknél, hosszútávú alkalmazása többek között hepatotoxicitással és hormonális hatásokkal is jár. Ezen szerek szájon át történő adagolása, valamint az alternatív szerekhez viszonyított jó tolerálhatósági profiljuk miatt ez a gyógyszerosztály előnyben részesített számos

klinikai forgatókönyvben, ahol tartós kezelésre van szükség. Azonban a gombaellenes szerek hosszadalmas alkalmazása aggályokat vethet fel a költségekkel, a rezisztencia kialakulásával és a kezeléssel összefüggő toxicitások kockázatával kapcsolatban (Benitez és mtsai. 2019). Ezen okoknál fogva fontos a fertőzés mielőbbi detektálása, majd az antimikotikum megfelelő dózisú alkalmazása a mellékhatások és a rezisztencia minimalizálásának érdekében. Ebből fakadóan keresünk egy olyan minimális gátló koncentráció kimutatására alkalmas módszertant, amely kivitelezhető a klinikai és mezőgazdasági gyakorlatban is.

II.4.2. *Metkonazol és vorikonazol*

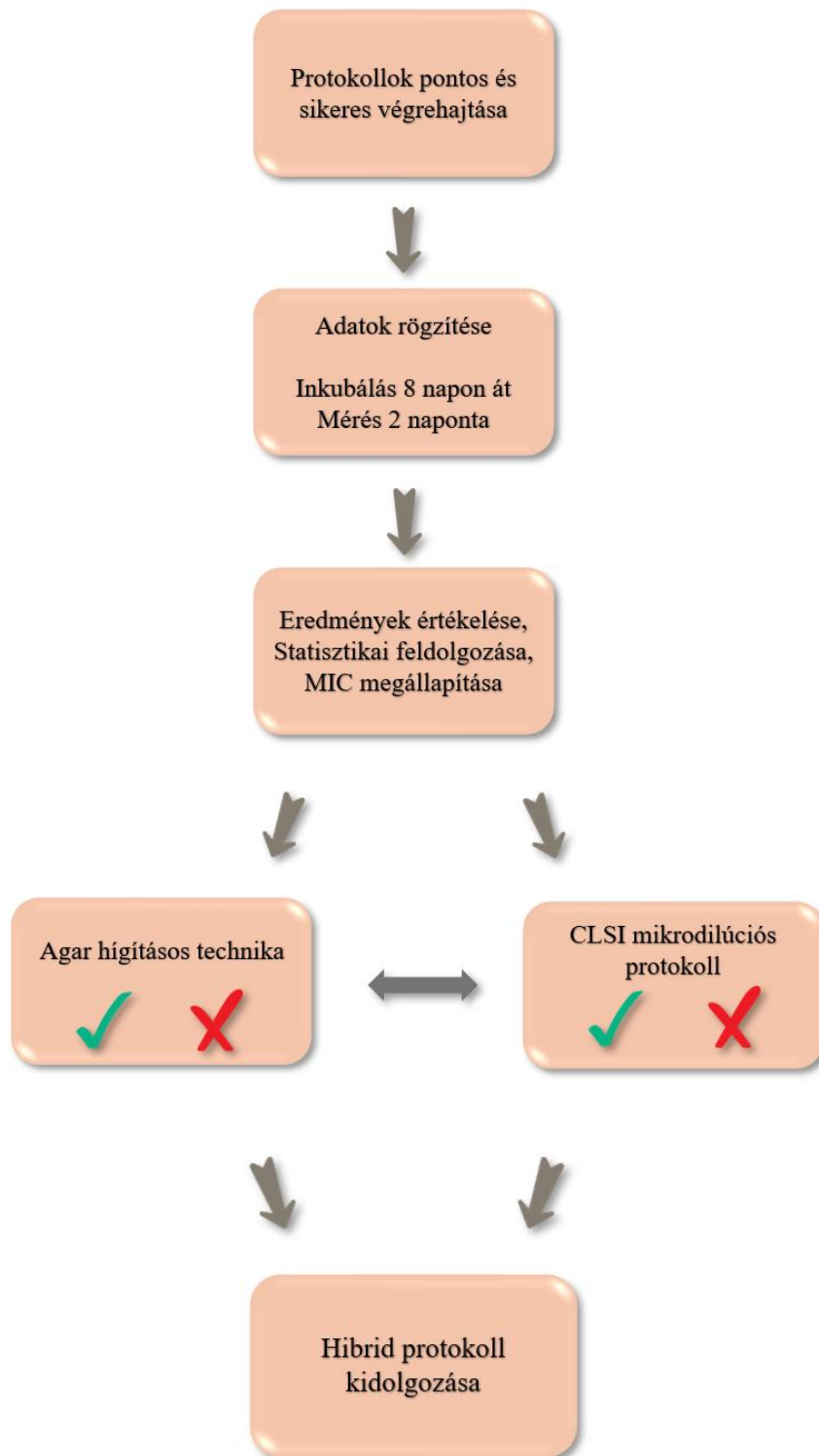
A vizsgálat során kettő az azolok csoportjába tartozó antifungális szer segítségével hasonlítottuk össze a választott eljárásokat. A vorikonazol és a metkonazol is az ergoszterin bioszintézis gátlásán keresztül fejti ki a hatását, az ergoszterin a gombasejtek membránjának egyik fontos komponense. Szintézisének gátlása megzavarja a sejtfal integritását, ami a gomba növekedésének és szaporodásának leállításához vezet. A vorikonazol az orvosi kezelés során használt szélesspektrumú gombaellenes szer, amelyet az invazív fertőzések esetén alkalmaznak. Számos gombafaj ellen hatékony, beleértve a különösen veszélyes *Aspergillus*, *Candida*, és egyéb penészgombákat, azonban a komoly mellékhatások miatt mérlegelni kell az alkalmazását. A metkonazolt elsősorban mezőgazdasági célokra használják, főként növényvédő szerként alkalmazzák, különböző gombás betegségek elleni védekezésben. Szélesspektrumú kezelő anyag, az optimális hatás érdekében a permetezést a fertőzés korai szakaszában vagy megelőző jelleggel végzik. Hosszútávú használatuk növeli a rezisztencia kialakulásának kockázatát (Spolti és mtsai. 2012, Paul és mtsai. 2018).

III. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálatom célja kettő, a klinikumban és kutatási gyakorlatban alkalmazott technika módszertani összehasonlítása. Ugyanis a különböző antimikotikumok alkalmazása során figyelembe kell venni a vegyület gombákra gyakorolt hatékonyságát, a rezisztencia kialakulásának lehetőségét, valamint a kémiai ágens egészségügyi hatását az alkalmazott szervezetre vagy a rövid- és hosszútávú következményeit a természetbe való kijuttatásának a permetszerként való alkalmazás során. Ezek fontos kérdések, amelyek megválaszolásához le kell helyezni a kutatás alappilléreit. Az egyik ilyen előfeltétel a megfelelő módszertan kiválasztása a gombák növekedésének detektálására. Vizsgálatomban kettő a gyakorlatban alkalmazott protokoll összehasonlításával szerettem volna feltérképezni azok előnyeit és hátrányait, valamint a minimális gátlókoncentráció megállapításában mutatott hatékonyságukat két jelentős patogén esetében olyan gombaellenes szereket alkalmazva, amelyek már használva vannak a gyakorlatban is. Ezek alapján a vizsgálat célja három fő pontban lett összefoglalva.

1. MIC (minimum inhibitory concentration) megállapítása *Aspergillus flavus* és *Aspergillus parasiticus* esetében.
2. Agar hígítási és CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) mikrodilúciós technika összehasonlítása a vizsgált *Aspergillus* fajok esetében.
3. A klinikumban (vorikonazol) és agráriumban (metkonazol) használatos antifungális szerek összehasonlítása.

Először szükséges volt a protokoll pontos és sikeres végrehajtása, a gombák detektálható növekedése és a megfelelő adatrögzítés. A MIC megállapításával láthatóvá válik, hogy a két különböző módszertant alkalmazva ugyanazon törzstenyészetek és antifungális szerek mellett van-e, és ha igen mekkora a különbség a MIC értékek között. Ezután pontokba szeretnénk szedni a két eljárás előnyeit és hátrányait, valamint feltárnánk az ezekből adódó esetlegesen eltérő MIC eredmények hátterét. Továbbá összehasonlítanánk a két azol típusú, de eltérő környezetben alkalmazott vegyületet, ugyanis viszonylag kevés adat áll rendelkezésre a pontos hatékony alkalmazási mennyiségükre ezen fajok, és összességében az *Aspergillus*-ok esetében is. Az összehasonlítás eredményei lesznek az alapja egy általánosan alkalmazható, szabványosítható protokoll kidolgozásának. A vizsgálati folyamat főbb lépései az alábbi ábrán láthatóak.



6. ábra: A vizsgálat lépései (saját ábra)

IV. ANYAG ÉS MÓDSZERTAN

IV.1. Gombatörzsek eltárolása

Az alábbi, kísérletek során alkalmazott gombatörzsek a Szegedi Mikrobiológiai Törzsgyűjteményből (SZMC) kerültek beszerzésre:

Aspergillus flavus (ATCC 204304)

Aspergillus parasiticus (SZMC2473)

A törzstenyészetekhez használt minták előkészítése SZMC munkatársaitól kapott protokoll alapján történt. A gomba PDA táptalajra lett oltva, ezt követte 7 nap inkubáció 25 °C-on, majd a spórák és micéliumok 20%-os glicerinnel oldatba lettek mosva. A kapott szuszpenzióknak először 4 °C-on 2 órán keresztül zajlott a hűtése, majd ezután történt a -80 °C-on való fagyasztás.

IV.2. Agar hígítási módszer

Az agar hígítási módszer során az antimikrobiális szer különböző, megfelelő koncentrációjú mennyiségét oldjuk a folyékony agar közegbe. A korong diffúzióval szembeni előnye, hogy így pontosan ismert a táptalajba bejutott fungicid mennyisége. Ez a technika alkalmas mind az antibakteriális, mind a gombaellenes érzékenység vizsgálatára. Gyakran ajánlják standardizált módszerként az igényes organizmusok, például az anaerobok és a *Helicobacter* fajok esetében. Gombaellenes szer-gyógyszer kombinációkhoz is használják *Candida sp.*, *Aspergillus*, *Fusarium* és dermatofyták ellen (Balouiri és mtsai. 2016; Veres 2019).

IV.2.1. Táptalaj

Potato Dextrose Agar (PDA)

39 g PDA táptalaj (Millipore, 110130)

1000 ml desztillált víz

121 °C-on 15 perc autoklávozás

1 ml 10%-os steril tejsav (Millipore 100366)

Az egységes méretű Petri-csészékbe 25 ml táptalaj került.

IV.2.2. Gombaellenes szerek

Az azolok a gombaellenes terápia sarokkövei széles hatásspektrumuk és könnyű beadhatóságuk miatt. A mezőgazdaságban fitopatogén gombák ellen és anyagmegőrzésre is használják. A kísérlet során por alapú metkonazol (Sigma-Aldrich 37909) és vorikonazol

(Sigma-Aldrich PHR1892) került felhasználásra, amelyeknek az oldatba vitele DMSO (dimetil-szulfoxid), (Sigma-Aldrich D8418) segítségével történt. Az elegy elkészítése előtt szükséges egy 0,22 µm-es membránszűrő (Millex SLGS033) segítségével a DMSO sterilizálása.

Az alkalmazott koncentráció tartományok metkonazol esetén Spolti és munkatársai (2012), vorikonazol esetén Paul és munkatársai (2018) munkája alapján kerültek meghatározásra. Ezek mintájára metkonazol esetén 10 µg/ml, vorikonazol esetén 8 µg/ml volt a maximálisan alkalmazott koncentráció. A beoldás során ezen koncentrációk százszoros töménységű oldatát kell elkészíteni, majd ezekből készült egy felező hígítási sor a nyolcadik hígítási lépésig.

µg/ 1 ml DMSO	
Metkonazol	Vorikonazol
10	8
5	4
2.5	2
1.25	1
0.625	0.5
0.312	0.25
0.156	0.125
0.078	0.0625

7. ábra: A metkonazol és vorikonazol felező hígítási sor

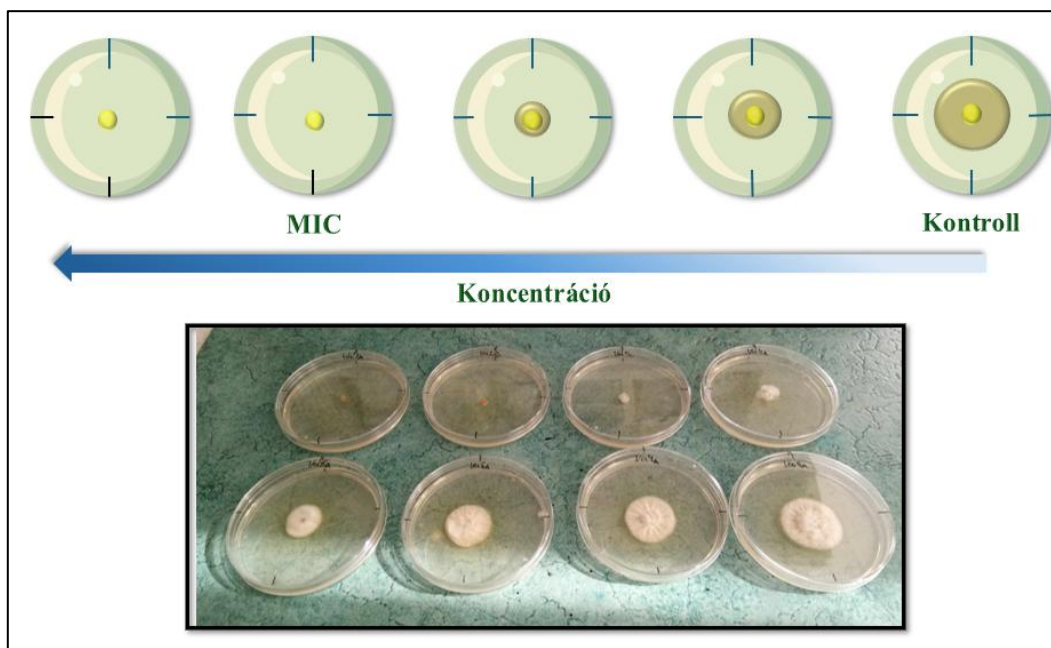
IV.2.3. Törzstenyészetek

Az *A. flavus* és *A. parasiticus* mintákból szükséges volt törzstenyészetek készítése. A -80 °C-ról elővett és kiolvadt szuszpenziókból 20 µl került kioltásra PDA táptalajra, amelyet egy 7 napos inkubáció követett 25 °C-on.

IV.2.4. Kísérlet összeállítása

Az összeállított PDA táptalajból 25 ml került kimérésre egy Petri-csészébe, amelyhez hozzáadásra került a megszilárdulás előtt 250 µl antifungális szer a megfelelő hígítási lépésből, ezzel megtörtént az antimikotikum százszoros hígulása. Az egységes eloszlás érdekében érdemes átmozgatni a csészéket a talaj beszáradása előtt. Egy kísérlet során minden hígítási lépésből három ismételtes készült. A megszilárdult táptalajra kerültek rá a micéliumos résszel lefelé 4 mm-es agar korongok, amelyek a 7 napos törzstenyészetből lettek kivágva dugófűrő segítségével. Ezután a Petri-csészék parafilmmel (Amcor PM-996) lezárásra kerültek, valamint az adatok egységes rögzítése érdekében egy vízszintes és függőleges tengely került bejelölésre. Szükség volt kontroll csészékre is, amelyeken a gombaellenes szer nélküli növekedés detektálható, ezen csészék táptalajához 250 µl DMSO lett hozzáadva, kizárva annak esetleges negatív vagy pozitív hatását a növekedésre. Az inkubáció 8 napon át tartott 25 °C-on, az adatok rögzítése 2 naponta történt a két tengely mentén milliméter pontos értékben.

IV.2.5. Eredmények feldolgozása



8. ábra: Az antifungális szer koncentrációjának növelésével csökken a telepátmérő növekedése (saját ábra)

Az adatok lejegyzése kizárólag jól körülhatárolható telepek esetén megvalósítható. Az ismétlések értékeiből kiszámításra került egy átlag és szórás, valamint a kontroll segítségével egy százalékos növekedési érték. 30%-os és afeletti szórás érték esetén kerültek kivételre a többitől eltérő, kiugró értékek. 10%-os növekedési érték alatt lett megállapítva a minimális gátló koncentráció.

IV.3. CLSI mikrodilúciós protokoll

A mikrodilúciós protokoll a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) nemzetközi, interdiszciplináris, nonprofit, szabványfejlesztő és oktatási szervezet által kidolgozott konszenzusos technika. A vizsgálat alapjául az M38-A2-es kiadás (Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard - Second Edition) szolgált. A protokollban leírtaktól eltérően nem vizuálisan történt a MIC megállapítása aszerint, hogy milyen koncentráció esetében nem fejlődött már a gomba, hanem Plate leolvasó segítségével szeretnénk volna számszerűsíteni a micélium növekedésének mértékét.

IV.3.1. Táptalaj

Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI)

2,1 g RPMI-1640 por (Sigma-Aldrich R6504)

6,9 g MOPS (4-Morpholinepropanesulfonic acid) (Serva 29836.03)

3,6 g glükóz (Millipore 1.08342)

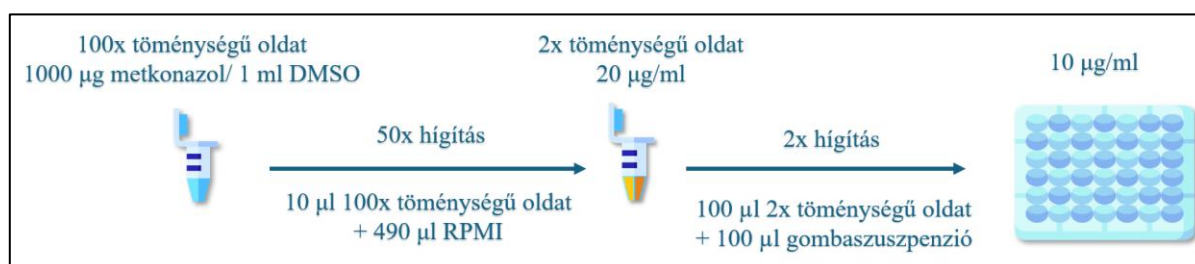
200 ml desztillált víz

7 pH beállítása NaOH vagy HCl segítségével

A táptalaj sterilizálása Millipore vákuumszűrővel történt, 0,22 μm -es membránszűrővel (Millipore GSWP04700). Tárolási hőmérséklet 2-8 $^{\circ}\text{C}$.

IV.3.2. Gombaellenes szerek

Az antifungális szerek koncentrációja megegyezik az 7. ábrán feltüntetett értékekkel, valamint a százszoros töménységű oldat elkészítése ekvivalens az agar hígítási technika esetében leírtakkal. Ezt követi egy ötvenszeres hígítási lépés RPMI segítségével.

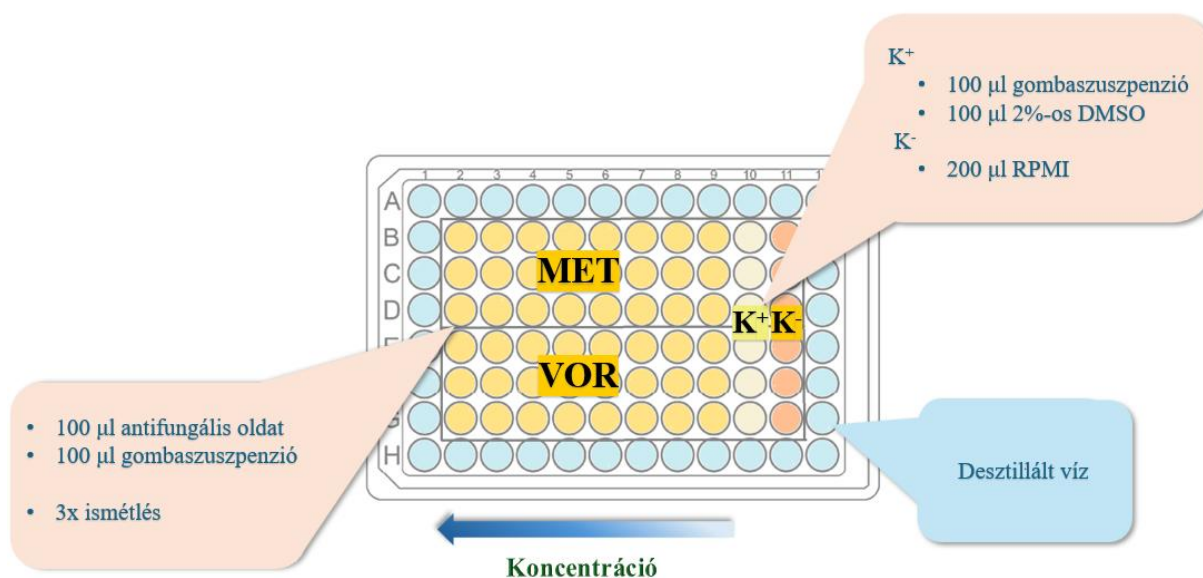


9. ábra: Az antifungális szer koncentrációjának alakulása 10 $\mu\text{g/ml}$ töménységű metkonazol példáján (saját ábra)

IV.3.3. Törzstenyészetek

Az *A. flavus* és *A. parasiticus* mintákból szükséges volt törzstenyészetek készítése. A -80 $^{\circ}\text{C}$ -ről elővett és kiolvadt szuszpenziókból 20 μl került kioltásra PDA táptalajra, amelyet egy 7 napos inkubáció követett 25 $^{\circ}\text{C}$ -on. A törzstenyészetekből szükséges micéliumszuszpenzió készítése, ehhez fiziológiás sóoldat lett rácsepegtetve a csészére, majd lemérve egy kémcsőbe. A gombaszuszpenzió koncentrációjának beállítása HITACHI U-2910 spektrofotométer segítségével történt 530 nm-en, 0,09 és 0,13-as OD (optikai denzitás) értékek között a protokollnak megfelelően. Ezt követte egy ötvenszeres hígítás RPMI segítségével.

IV.3.4. Kísérlet összeállítása



10. ábra: Microplate összeállítása, MET – metkonazol és gombaszuszpenzió elegye, VOR – vorikonazol és gombaszuszpenzió elegye, K⁺ - pozitív kontroll, K⁻ - negatív kontroll (saját ábra)

A kísérlet egy 96 cellás mikrotiter lemezben (ThermoFischer 92096) került összeállításra, a 10. ábrán látható felépítésben. Egy cellába 200 µl mennyiségű anyag fér bele. A 100 µl antimikotikum és 100 µl micéliumszuszpenzió összemérésével felére hígul az antifungális szer, így megkaptuk a kívánt koncentrációt. A felező hígítási sor tagjai egymás mellé egy sorban kerültek bemérésre (pl. metkonazol esetén B2 – 10 µg/ml, B3 – 5 µg/ml, B4 – 2.5 µg/ml stb.), valamint minden meghatározott koncentráció esetén három ismételtes készült (pl. metkonazol 10 µg/ml ismételtesei a B2, C2, és D2 cellákba lettek bemérve). Szükség volt egy pozitív kontrollra, amely az antifungális nélküli növekedést hivatott bemutatni, az agarhígítási módszerhez hasonlóan itt is lett DMSO hozzáadva, kizárva a hatását a gomba növekedésére. A negatív kontroll esetén meg csak RPMI került bemérésre, ugyanis magának a tápoldatnak is van fényelnyelése, ennek az értéke is detektálásra került. A mikroplate szélére a szélhatás miatt 200 µl desztillált víz került bemérésre. Az inkubáció 35 °C-on zajlott 8 napig, az adatok rögzítése két naponta zajlott Plate leolvasó (Thermo Scientific Multiskan Ex 200-240V Microplate leolvasó 4509-10206185-0) segítségével 530 nm-en.

IV.3.5. Eredmények feldolgozása

A Plate leolvasó segítségével rögzítve lettek az abszorbancia értékek. A negatív kontroll értékek átlagolva lettek, majd ezután kivonásra került a kapott értékekből. Ezután átlagoltásra került az ismételtesek értéke is, kiszámításra került a szórás, majd a növekedés százalékos értéke a pozitív

kontrollhoz képest. 30%-os szórás érték felett a kiugró értékek kivételre kerültek, a MIC 10%-os növekedés alatt lett kijelölve.

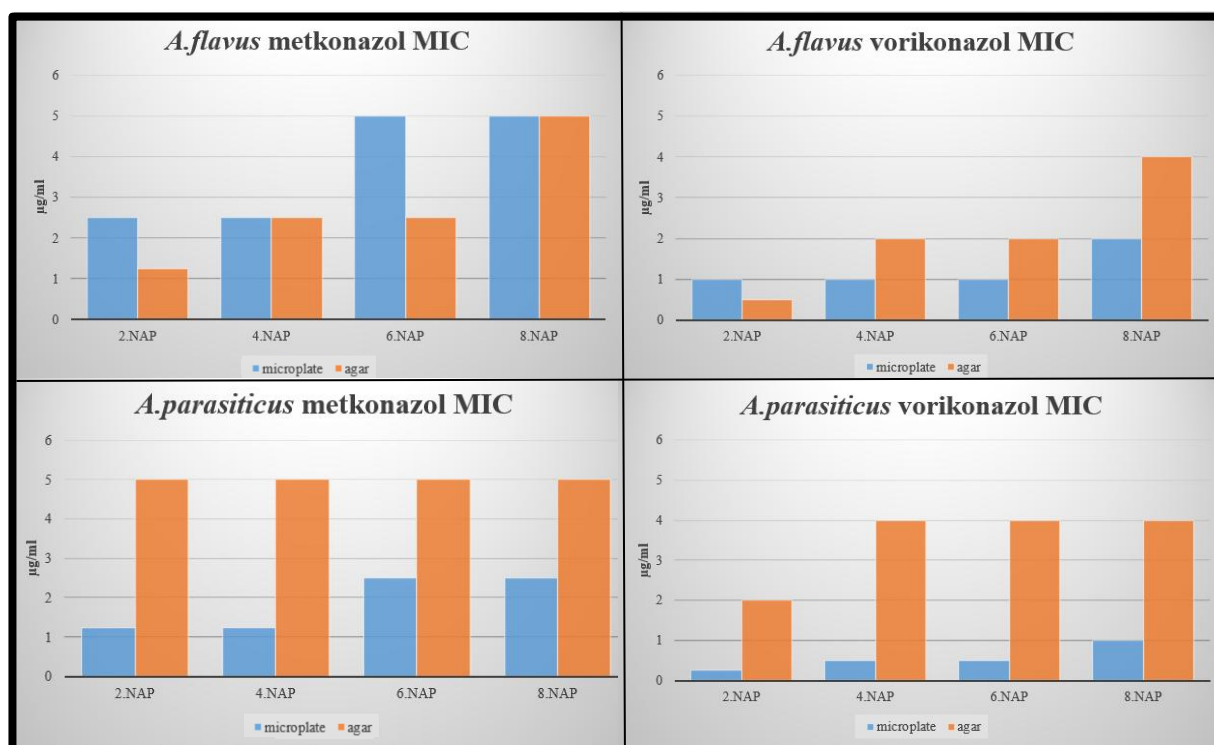
IV.4. Összehasonlíthatóság

A vizsgálat célja a módszertani összehasonlítás volt, ennek megfelelően a kísérletek összehangolása egy fontos szempont. Egy ismétlés alkalmával mind a két protokoll szerint ugyanazon a napon el lett indítva a kísérlet, ugyanazon Petri-csészéről származó törzstenyészetéről. Az inkubáció 8 napon át zajlott, 2 naponta lettek rögzítve az adatok mind a két esetben. Valamint a frissen elkészült felező hígítási sor oldatba vitele olyan mennyiségben történt, hogy a százszoros töménységű oldatot mind a két módszerhez fel lehessen használni az adott ismétlés alkalmával.

V. EREDMÉNYEK

V.1. MIC (minimum inhibitory concentration) megállapítása *Aspergillus flavus* és *Aspergillus parasiticus* esetében

Mindenekelőtt elmondható, hogy sikeresen végbement a kísérlet, sikerült detektálni a gombák növekedését, valamint a gombaellenes szerek hatását. *A. flavus* és *A. parasiticus* esetén is megállapíthatóak voltak a MIC értékek az alkalmazott koncentráció tartományokon belül, azonban néhány esetben jelentős különbségeket tapasztaltunk a két módszertan eredményei között. A 11. ábrán látható, hogy az *A. parasiticus* esetében jelentősebb a két protokoll eredményei között a különbség, ezenkívül, habár a napok elteltével a legtöbb esetben változik a MIC értéke, ennél a fajnál kisebb ez a változás, mint az *A. flavus* esetében. Összességében megállapítható, hogy az agar hígítási módszert tekintve nagyobb koncentráció volt szükséges az antimikotikumokból a gátlás eléréséhez, ugyanakkor érdekes kivétel ez alól az *A. flavus* és metkonazol esete, ahol a CLSI mikrodilúciós technika hozta a magasabb MIC értékeket. Mindent egybevetve kijelenthető, hogy a MIC értékek az antimikotikum koncentráció tartományokhoz felhasznált publikációkban lévő tartományokba esnek, azonban van különbség a két eljárás eredményei között. Emellett megállapítható az is, hogy érdemes az adatokat több napon át rögzíteni, mivel az idő múlásával változhat a gátló koncentráció értéke. Ez azért fontos, mivel létezik több eljárás mód, ahol csak egy, maximum két alkalommal detektálják az adatokat.



11. ábra: *A. flavus* és *A. parasiticus* átlagolt MIC eredményei metkonazol és vorikonazol esetében. Microplate – CLSI mikrodilúciós protokoll, agar – agar hígítási módszer

V.2. Agar hígítási és CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) mikrodilúciós technika összehasonlítása *Aspergillus* fajok esetében

V.2.1. Agar hígítási technika

Az agar hígítási módszer egy durvább eljárás, ahol a telepátmérők emberi szemmel, milliméteres nagyságban kerültek leolvasásra, a nagy egészet tekintve ez egy hosszadalmasabb folyamat, mind az összeállítást, mind az adatok leolvasását tekintve. A reprodukálhatóságot nehezítő tényező az agar korongok megfelelő kivágása és csészére helyezése, ugyanis a micélium jelentősen behatol a táptalajba, így problémát okozhat a pontos, egyazon méretű korongok kimetszése. Emellett egy fontos fajsztípus különbség volt az, hogy az *A. flavus* jelentős mennyiségű spórát termelt, amely a korong felhelyezésekor több esetben szétszóródhatott, így nem egy jól definiált telep nőtt a talajon, hanem több kisebb, amely így megnehezítette vagy lehetetlenné tette a telepek pontos leolvasását (12. ábra). Valamint ügyelni kellett rá, hogy megfelelő mennyiségű gomba legyen a korongon, ugyanis, ha minimális a micélium vagy a spóra mennyisége, akkor kisebb mennyiségű antimikotikum is elpusztíthatja mielőtt növekedni kezdené a telep, ezáltal megtévesztő eredményeket produkálhat a mérés.



12. ábra: *A. flavus* esetén több kisebb telep növekedése (saját képek)

Az ismétléseket tekintve az agar hígítási módszer esetén egybevágóbb MIC értékek születtek, azonban ez adódhat a módszer viszonylagos durvaságából, ugyanis átlagosan jóval nagyobb gátlási koncentrációs értékeket mutatott. Valamint érdekes további kutatási irány a gombák antifungális szerekre mutatott morfológiai változása, amely jól nyomon követhető ezen módszertan esetében.



13. ábra: *A. parasiticus* morfológiai változása az antimikotikumok hatására (saját képek)

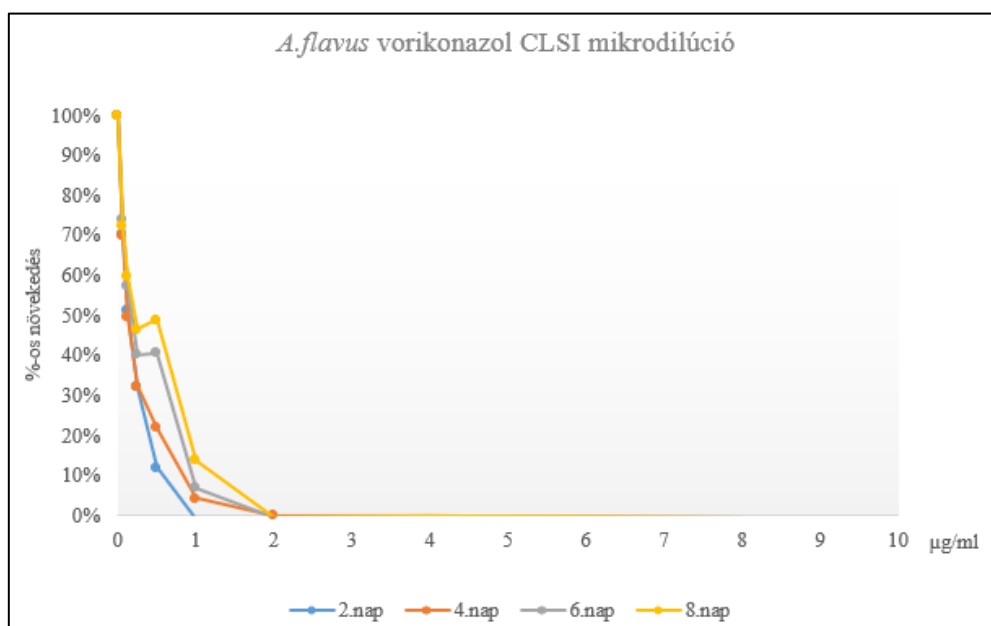
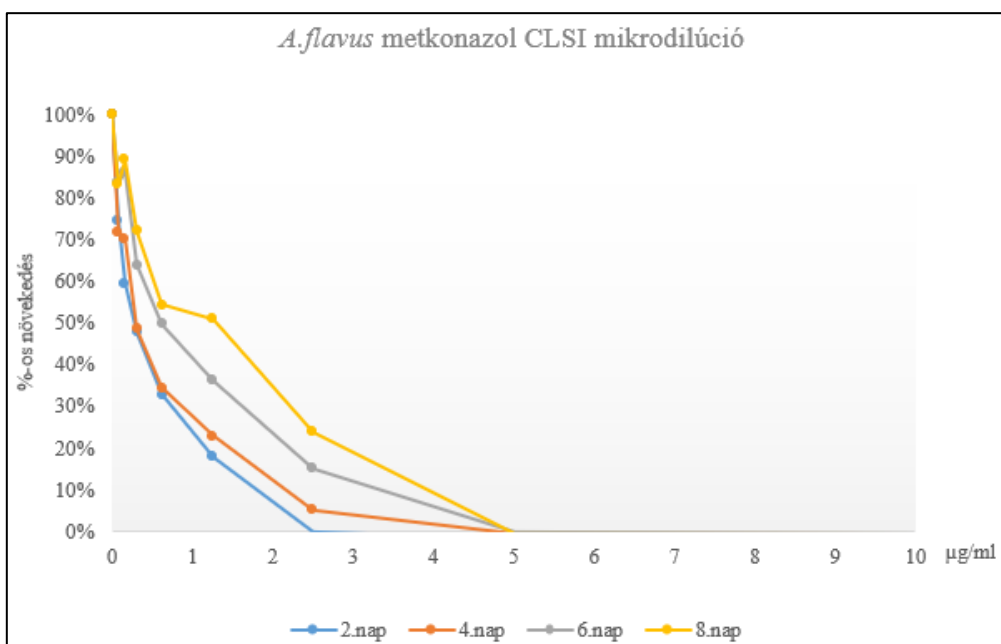
V.2.2. CLSI mikrodilúciós technika

A mikrodilúciós módszer egy könnyebben és gyorsabban összeállítható protokoll, ahol egy megfelelően előkészített micéliumszuszpenzió biztosítja az egységes ismételéseket, és így a jobb reprodukálhatóságot. Átlagosan tekintve alacsonyabb MIC értékeket eredményezett, amely az érzékenyebb eljárasmódból adódhat, ugyanis az agar hígítással ellentétben nem az emberi szemre van bízva az értékek leolvasása, hanem egy műszer, a Plate leolvasó mérte le a megfelelő hullámhosszon az abszorbancia értéket, azaz a minta fényelnyelését, amelyből a micélium sűrűsége lehet következtetni. Ezen mérés hátránya, hogy a gombaszuszpenzió és az antifungális szer keveréke nem homogén így, ha a műszer által kibocsátott fénynyaláb egy denzebb micélium hálózatot talált el, akkor jóval magasabb növekedési értéket kaptunk, mint a többi mérés esetén, így ezeket a kiugró értékeket ki kellett venni, amely csökkenti az összehasonlítható ismételések számát. A mérés során minden alkalommal le kell venni a mikrotiter lemez fedelét, és úgy behelyezni az eszközbe, ezáltal a minták ki vannak téve a befertőződés veszélyének.

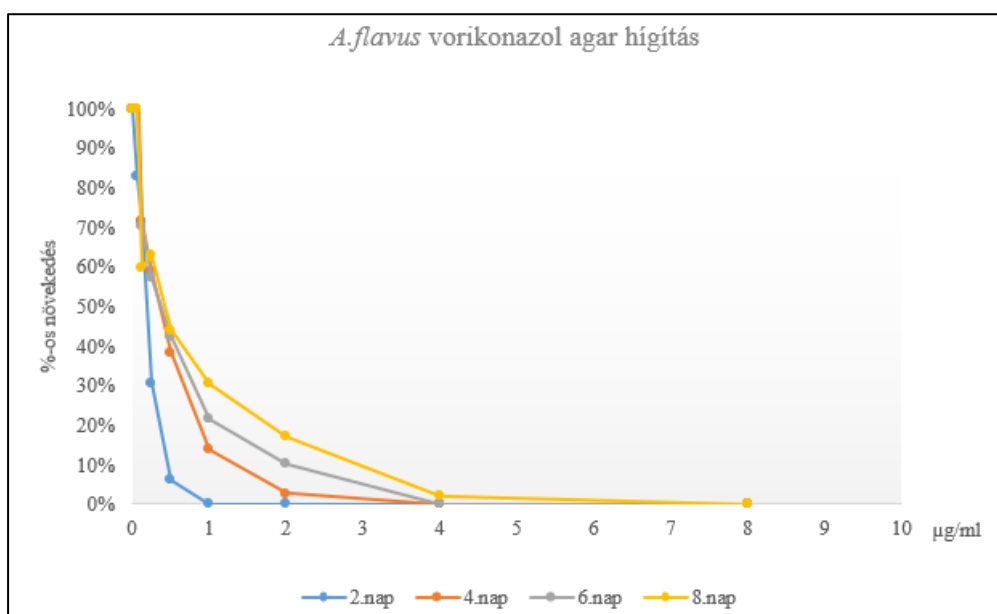
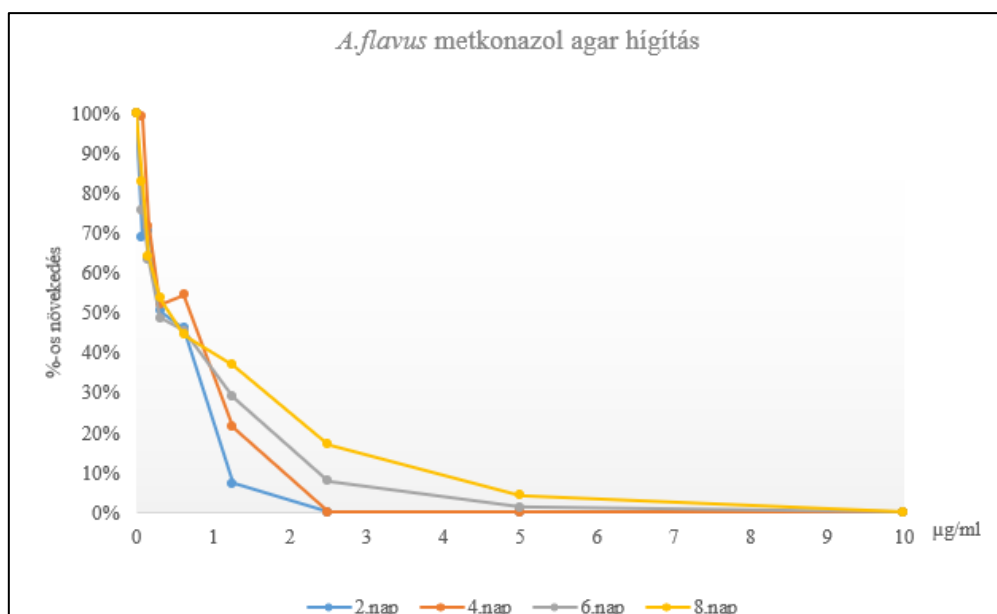
V.3. A klinikumban (vorikonazol) és agráriumban (metkonazol) használatos antifungális szerek összehasonlítása

Mind a két vizsgált vegyület azol típusú, és az ergoszterin bioszintézis gátlásán keresztül akadályozzák a gombák növekedését. A MIC értékeket összevetve a vorikonazol hatékonyabbnak bizonyult a két vizsgált faj esetében. Azonban 5%-os szignifikancia érték mellett a két vegyület között szignifikáns különbség csak a CLSI mikrodilúciós technika esetében határozható meg, amely bizonyítja a módszer érzékenyebb mivoltát (14-15. és 18-19. ábra). Valamint megjegyzendő, hogy az *A. flavus* és *A. parasiticus* esetében eltérő MIC értékeket kaptunk, amely rámutat arra, hogy ugyanaz a gombaellenes szer a két eltérő *Aspergillus* faj esetében más mennyiségben hatásos.

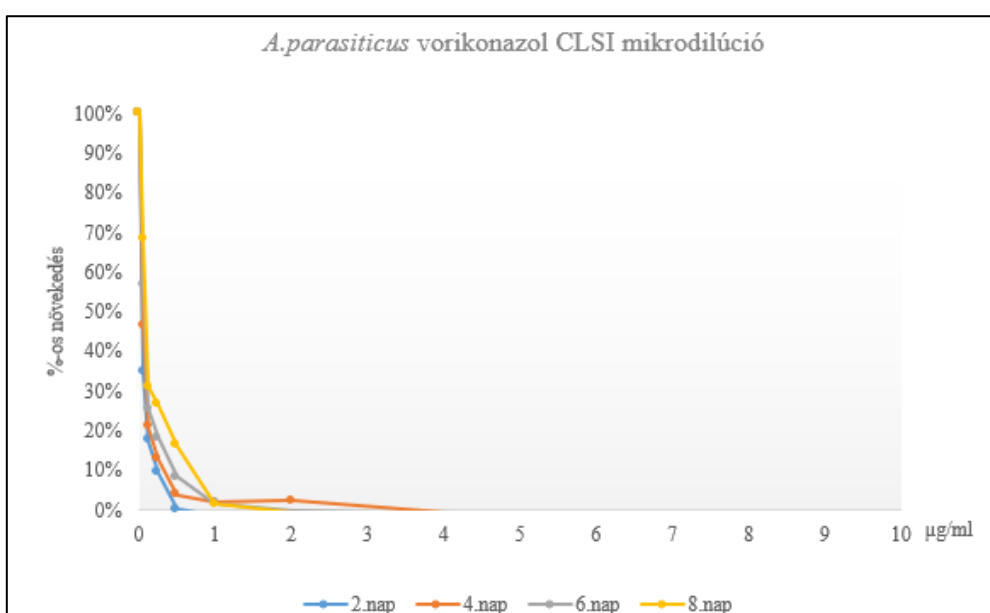
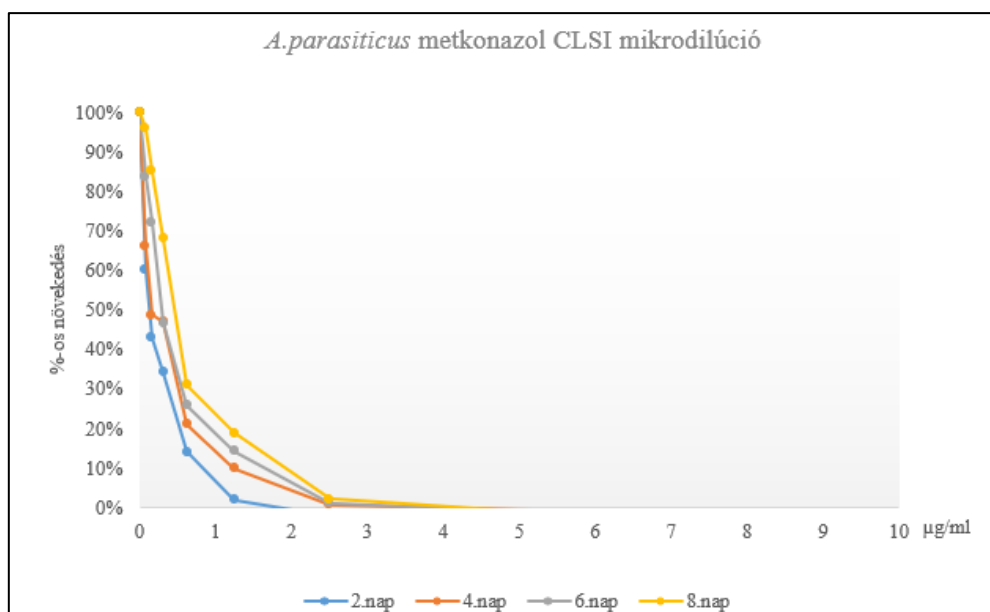
Az *A. flavus* és *A. parasiticus* esetében is két-két ismételés lett elvégezve, egy ismételés alkalmával mind a kettő módszertannal és vegyülettel. A kapott értékekből százalékos növekedési értékek lettek kiszámolva a kontroll értékekhez viszonyítva. Az ismétlések növekedési értékei átlagolva lettek, és a mérési napok távlatában az alábbi grafikonokon feltüntetésre kerültek a jobb összehasonlíthatóság érdekében. Az x tengelyen az alkalmazott gombaellenes szer koncentrációja, az y tengelyen a gomba százalékos növekedési értéke látható.



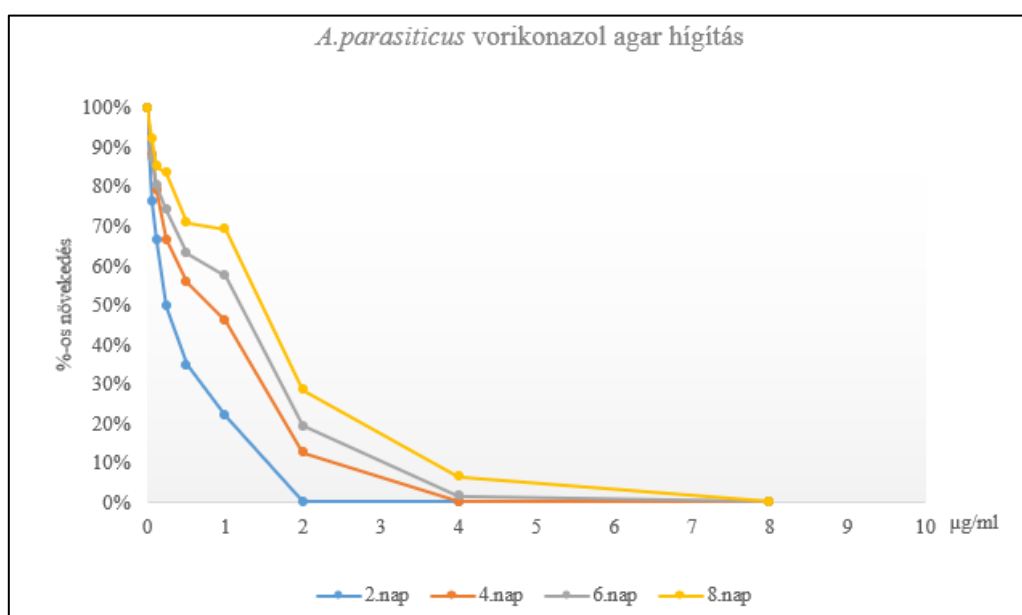
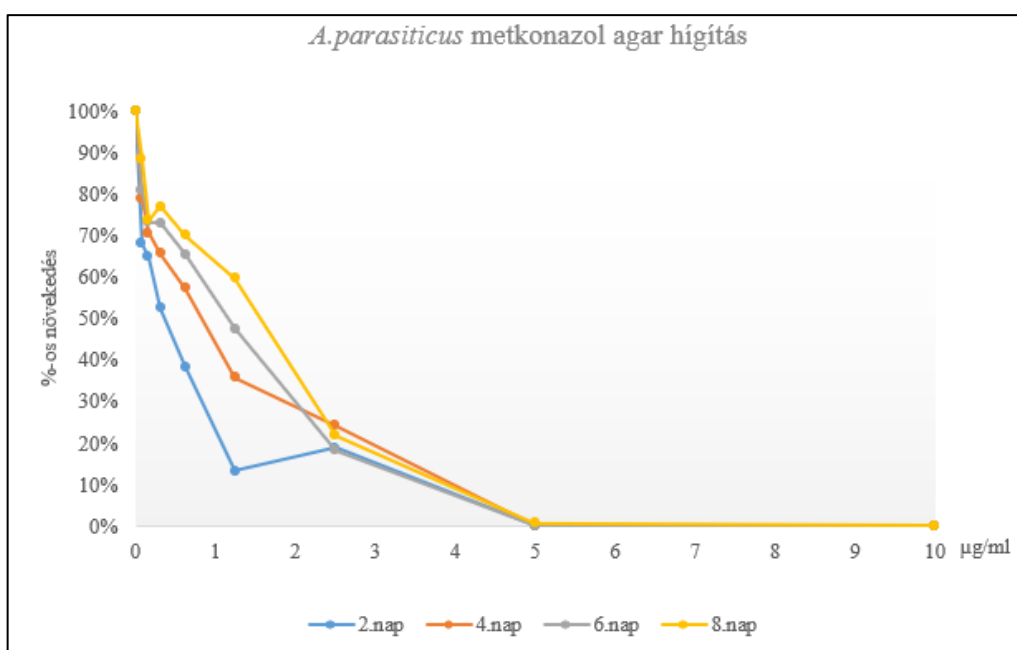
14-15. ábra: *A. flavus* metkonazol és vorikonazol összehasonlítás CLSI mikrodilúció esetén



16-17. ábra: *A. flavus* metkonazol és vorikonazol összehasonlítás agar hígítás esetén



18-19. ábra: *A. parasiticus* metkonazol és vorikonazol összehasonlítás CLSI mikrodilúció esetén



20-21. ábra: *A. parasiticus* metkonazol és vorikonazol összehasonlítás agar hígítás esetén

VI. DISZKUSSZIÓ

Az *Aspergillus* nemzetség, és az azon belül a dolgozatban is szereplő két faj méltán hírhedt az emberiség körében, ugyanis egyaránt veszélyt jelenthetnek az állatokra, növényekre és az emberekre is. Súlyos betegség az aszpergillózis, amely az immunhiányos betegek esetében fokozottan magas halálozási rátával jár. Kiemelendő az *A. flavus* és az *A. parasiticus* által egyaránt termelt másodlagos anyagcsere termék, az aflatoxin is, ami a természetben előforduló egyik legerősebb rákkeltő anyag. Az *A. flavus* már jelen van Magyarországon, azonban a klímaváltozás miatt az *A. parasiticus* egyre gyakoribb megjelenésére is számítani lehet, ugyanis a határos országokban már tartósan detektálták a felbukkanását. A veszélyt szem előtt tartva fontos a folyamatos monitorozás, a tudatos megelőző eljárások és a fertőzés mielőbbi detektálása, mind a páciensek, mind a termesztett növények tekintetében. Létezik többféle eljárás a megjelenés, a növekedés és a gátlás kimutatására, ezek felülvizsgálata, kiterjesztése és megújítása állandó feladat. Vizsgálatom során kettő, a gyakorlatban is alkalmazott MIC megállapításra alkalmas módszertant hasonlítottam össze, két olyan kórokozó esetében, amelyeknek rendkívül aktuális a kutatása, megteremtve a további vizsgálatok alappilléret.

Mind a kettő protokoll alkalmas az *Aspergillus*-ok megfigyelésére. Várható tapasztalat volt, hogy lesz különbség a két metódus minimális gátló koncentráció értékei között. Szakirodalmi forrásokat felhasználva sikerült megfelelő koncentráció tartományokat kiválasztani, amely minden esetben magába foglalta a MIC értéket. Érdekes fejlemény, hogy az *A. parasiticus* esetében hangsúlyosabb volt a két protokoll által kapott MIC értékek különbsége, tehát lehet fajszintű különbség a kimutatás pontosságában. Ezt alátámasztja az a megfigyelés, hogy az *A. flavus* az agar hígítási módszer esetében gyakran több apró telepet képzett, ezzel befolyásolva a mérést, feltételezésünk szerint ez a jelenség a nagyobb mértékű spóra termelésnek tudható be. Az inkubáció 8 napon át tartott, és 2 naponta kerültek rögzítésre az adatok. Az eredményekből látható, hogy a legtöbb esetben az idő előrehaladtával nő a MIC értéke, ezzel bizonyítva, hogy érdemes több napon át rögzíteni az adatokat, valamint a többnapos adatrögzítés lehetővé teszi a többszöri kezelés hatásának vizsgálatát is. Kivitelezést tekintve az agar hígítási eljárásnál hosszadalmasabb az összeállítás, több befektetett munkát és ügyességet igényel, a mérés Petri-csészénként egyesével zajlik, így időigényes, valamint a törzstenyészetből kivágott 4 mm-es agar korongok egységes kivitelezése sem probléma mentes. Általánosan elmondható, hogy egy durvább módszer, amely magasabb koncentrációs értékeknél mutatott gátlást, azonban ez nem feltétlen törvényszerű, amely jól látható az *A. flavus* és a metkonazol MIC értékek példáján (11. ábra). A CLSI mikrodilúciós protokoll, egy gyorsabban, kis területen összeállítható vizsgálati

rendszer, amelynél sokkal alacsonyabb a reagens- és helyigény, valamint az adatok rögzítésekor nem kell ügyelni arra, hogy mindig ugyanaz a személy olvassa le, ugyanis a műszer nagyobb hatékonysággal, egyszerre, azonos módon méri le az összes cella tartalmát. Azonban kiugró eredmények adódtak a keverék heterogenitásából, amely befolyásolhatja a kiértékelést, emellett fokozott a befertőződés esélye a fedél eltávolítása miatt. Felvetődhet a kérdés, hogy befolyásolja-e gombák növekedését a 2 naponta az inkubációs hőmérsékletről történő kivétel és a fedő eltávolítása. Kutatócsoportunkban zajlott egy erre irányuló kísérlet, amely során két mikrotiter lemez lett összehasonlítva, az egyikben 2 naponta megtörtént a növekedés detektálása, a másikban pedig csak a nyolcadik napon. Az eredményeket tekintve nem volt kimutatható szignifikáns különbség a két mikroplate eredményei között, tehát a rendszeres mérés nem befolyásolja a növekedést.

A metkonazol és vorikonazol összehasonlításából is láthatóvá vált, hogy a mikrodilúciós technika pontosabb eredményeket produkál, ugyanis annak segítségével megállapíthatóvá vált a hatékonyabb vegyület, míg az agar hígítás esetében sokkal hasonlóbb lefutású görbék születtek.

Mind a két technika előnye, hogy „alap” eszközökkel és műszerekkel véghez vihetők, az adatok leolvasása és értékelése viszonylag egyszerű. Mindent egybevetve a hosszútávú további kísérletek lebonyolításához ideális módszertan a CLSI mikrodilúciós technika, azonban a tapasztalt előnyöket és hátrányokat figyelembe véve jövőbeli célkitűzés egy hibrid módszertan kidolgozása. A kísérlet alapja az agar hígítási módszer lenne, a PDA táptalajban oldott antifungális szerrel, amelyre nem agar korongon keresztül kerülne fel a vizsgált gomba, hanem a mikrodilúció során használt micélium szuszpenzió lenne rácsepegtetve. Ezzel kiküszöbölésre kerülne az agar korong problémája, a spórák szétszóródása, a Plate leolvasó esetében a heterogenitásból jelentkező kiugró értékek, valamint a mikrotiter lemez felnyitásából adódó befertőződés. A hibrid módszer egyik előnye, hogy láthatóak lesznek a morfológiai változások a gombákon, amely érdekes további kutatási irányban nyitja meg az utat.

A vizsgált vegyületek más mennyiségben voltak hatásosak a két faj esetében, ez rávilágít arra, hogy az *Aspergillus*-okra alkalmazott gátló szerek adagolását, nem csak a nemzetség szintjén érdemes beállítani, hanem faji szinten is a pontos adagolás érdekében. Erre jó példa a két vizsgált antimikotikum, ugyanis a metkonazol esetében, amelyet az agráriumban használnak viszonylag hamar alakul ki rezisztencia, a vorikonazol pedig egy rendkívül erős gyógyszer, amelyet csak súlyos fertőzések esetén adnak, mivel komoly mellékhatásokkal rendelkezik. A

megfelelő dózis meghatározása kulcsfontosságú a kezelés során, amely meghatározásához a legideálisabb protokollt kell alkalmazni. Ha túl alacsony mennyiségű a vegyület, akkor nem fogja gátolni a növekedést, ha olyan mennyiségű, amely már stressznek teszi ki a gombát, de még nem gátolja teljesen, akkor fokozódhat a mikotoxin termelés, ha túl nagy, akkor nő a környezeti terhelés is a felesleges alapanyag pazarlás mellett. A kísérlet kiterjesztése során a hibrid protokollal szeretnénk egy szabványosítható eljárást kidolgozni, amely alap, könnyen beszerezhető elemek segítségével végrehajtható, valamint nem igényel speciális szaktudást, így könnyen alkalmazható az agrár szférában is. A módszer kidolgozása után több *Aspergillus* faj is bevonásra kerülne a vizsgálatba, hogy kiderítsük a technika hatékonyságát más célcsoportok esetében is.

VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőimnek, Dr. Czéh Árpádnak és Makkai Enikőnek a munkát és a belém fektetett bizalmat, a mikrobiológia laboratóriumban dolgozó munkatársaknak a segítséget, valamint a Soft Flow-nak a kutatásom elvégzéséhez szükséges eszközök biztosítását. Köszönöm a családomnak, hogy támogatnak a tanulmányaim elvégzésében. Valamint a páromnak, hogy mellettem volt a munkám során és támaszt nyújtott a nehéz időkben.

VIII. FORRÁSOK

- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). *Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review*. Journal of Pharmaceutical Analysis, 6(2), 71–79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
- Battilani, P., Toscano, P., Van der Fels-Klerx, H. et al. *Aflatoxin B₁ contamination in maize in Europe increases due to climate change*. Sci Rep 6, 24328 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep24328>
- Benitez, L.L., Carver, P.L. *Adverse Effects Associated with Long-Term Administration of Azole Antifungal Agents*. Drugs 79, 833–853 (2019). <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01127-8>
- Cadena, J., Thompson, G. R., & Patterson, T. F. (2021). *Aspergillosis. Infectious Disease Clinics of North America*, 35(2), 415–434. doi:10.1016/j.idc.2021.03.008
- CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard—Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008. ISBN 1-56238-668-9
- Cotty, P. J., and Jaime-Garcia, R. (2007). *Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination*. Int. J. Food Microbiol. 119, 109–115. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.060
- Eskola, M., Kos, G., Elliott, C. T., Hajšlová, J., Mayar, S., Krska, R. (2019). *Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited “FAO estimate” of 25%*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1–17. doi:10.1080/10408398.2019.1658570
- European Union. (2023). *Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in foodstuffs*. EUR-Lex. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/?uri=CELEX%3A32023R0915&qid=1736588124890>
- Fleurat-Lessard, F. (2017). *Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seedborne fungi and contamination by storage mould mycotoxins – An update*. Journal of Stored Products Research, 71, 22–40. doi:10.1016/j.jspr.2016.10.002

- Leslie, J.F.; Moretti, A.; Mesterházy, Á.; Ameye, M.; Audenaert, K.; Singh, P.K.; Richard-Forget, F.; Chulze, S.N.; Del Ponte, E.M.; Chala, A.; et al. (2021) *Key Global Actions for Mycotoxin Management in Wheat and Other Small Grains*. *Toxins* 2021, 13, 725 doi.org/10.3390/toxins13100725
- Mesterházy, Á., Szieberth, D., Szabó, B. et al. *Mycotoxin contamination of maize (Zea mays L.) samples in Hungary, 2012–2017*. (2022) *CEREAL RESEARCH COMMUNICATIONS* 50, 1065–1073. doi.org/10.1007/s42976-022-00258-1
- Nikolić, M., Savić, I., Nikolić, A., Jauković, M., Kandić, V., Stevanović, M., & Stanković, S. (2021). *Toxigenic Species Aspergillus parasiticus Originating from Maize Kernels Grown in Serbia*. *Toxins*, 13(12), 847. https://doi.org/10.3390/toxins13120847
- Paul, R. A., Rudramurthy, S. M., Dhaliwal, M., Singh, P., Ghosh, A. K., Kaur, H., Varma, S. Agarwal, R., Chakrabarti, A. (2018). *Voriconazole resistance in clinical and environmental isolates of Aspergillus flavus - frequency and investigation into the role of multidrug efflux pumps*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. doi:10.1128/aac.01022-18
- Pleadin, J., Frece, J., Markov, K. (2019). *Mycotoxins in food and feed*. *Advances in Food and Nutrition Research*, 297–345. doi:10.1016/bs.afnr.2019.02.007
- Rudramurthy, S. M., Paul, R. A., Chakrabarti, A., Mouton, J. W., & Meis, J. F. (2019). *Invasive Aspergillosis by Aspergillus flavus: Epidemiology, Diagnosis, Antifungal Resistance, and Management*. *Journal of Fungi*, 5(3), 55. doi:10.3390/jof5030055
- Sebők, F., Dobolyi, C., Zágoni, D., Risa, A., Krifaton, C., Hartman, M., Cserhádi, M., Szoboszlay, S., Kriszt, B. (2016). *Aflatoxigenic Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus strains in Hungarian maize fields*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 63(4), 491–502. doi:10.1556/030.63.2016.012
- Spolti, P., Jorge, B. C. de, & Del Ponte, E. M. (2012). *Sensitivity of Fusarium graminearum causing head blight of wheat in Brazil to tebuconazole and metconazole fungicides*. *Tropical Plant Pathology*, 37(6), 419–423. doi:10.1590/s1982-56762012000600007
- Ülger, T. G., Uçar, A., Çakıroğlu, F. P., Yilmaz, S. (2020). *Genotoxic effects of mycotoxins*. *Toxicon*, vol. 185, Oct. 2020, pp doi:10.1016/j.toxicon.2020.07.

Veres, Cs. (2019). Illóolajok hatása toxintermelő fonalaszomba fajokra. Doktori értekezés, Szegedi Tudományegyetem

Wu, F. Mycotoxin Risks Are Lower in Biotech Corn. (2022) *Current Opinion in Biotechnology*, Current Opinion in Biotechnology, Volume 78, 102792, doi:10.1016/j.copbio.2022.102792