

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar

XXXI. OTDK Biológia szekció

**SZEMFERTŐZÉSEKBŐL SZÁRMAZÓ
ASPERGILLUS FLAVUS-ROKON
IZOLÁTUMOK MOLEKULÁRIS
JELLEMZÉSE**

Készítette: Samu Aliz
Biológia szak, III. évfolyam

Témavezetők: Dr. Varga János, Baranyi Nikolett

2012

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	3
1.1. Általános áttekintés	3
1.2. A szem gombás megbetegedései	3
1.3. Az <i>Aspergillus</i> nemzetség <i>Flavi</i> szekciója	4
1.3.1. <i>Aspergillus flavus</i>	5
1.3.2. <i>Aspergillus tamarii</i>	6
1.4. Aflatoxinok	8
1.5. Az <i>Aspergillus</i> fajok szaporodása	10
1.5.1. Genomi bizonyítékok az aszexuális <i>Aspergillus</i> fajokban a párosodási képességre	10
2. CÉLKITŰZÉSEK	12
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	13
3.1. Felhasznált törzsek	13
3.2. Táptalajok, tápoldatok	14
3.3. Tiszta tenyészet létrehozása	14
3.4. DNS izolálás	14
3.4.1. Felhasznált oldatok, eszközök	14
3.5. Az izolátumok molekuláris azonosítása kalmodulin szekvenciák alapján	15
3.5.1. Felhasznált oldatok, eszközök	15
3.5.2. Cmd5 és Cmd6 indító szekvenciák	15
3.5.3. A kalmodulin PCR reakcióelegy összetétele	15
3.5.4. A kalmodulin PCR program	16
3.6. UP-PCR (universally primed polymerase chain reaction) analízis	16
3.6.1. Az alkalmazott primerek	16
3.6.2. Az UP-PCR reakcióelegy összetétele	16
3.6.3. Az UP-PCR program	17
3.7. Az izolátumok aflatoxin termelő képességének vizsgálata	17
3.7.1. Aflatoxin extrakció	17
3.7.2. Vékonyréteg kromatográfia (TLC)	17
3.7.3. HPLC analízis	18
3.8. Az <i>Aspergillus</i> izolátumok párosodási típus génjeinek vizsgálata	18
3.8.1. Felhasznált oldatok, eszközök	18
3.8.2. Felhasznált indító szekvenciák	18
3.8.3. A PCR reakcióelegy összetétele	19
3.8.4. A PCR program	19
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELES	20
4.1. Az izolátumok fajszerű azonosítása	20
4.2. Az <i>Aspergillus</i> izolátumok párosodási típus génjeinek vizsgálata	20
4.3. Az <i>Aspergillus pseudotamarii</i> izolátum jellemzői	22
4.4. Az izolátumok genetikai variabilitásának vizsgálata	24
4.5. Az izolátumok aflatoxin termelő képességének vizsgálata	24
5. ÖSSZEFOGLALÁS	27
6. IRODALOM	28
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	34
NYILATKOZAT	35

1. BEVEZETÉS

1.1. ÁLTALÁNOS ÁTTEKINTÉS

Napjainkban az *Aspergillus* fajok egyre gyakrabban okoznak opportunistá mikózisokat immunszupresszált betegekben. Ennek fő okai a modern immunoszipresszáns terápia terjedése, és a szervátültetések növekvő száma évről évre (Cohen és mtsi 1993). A fertőzés leggyakrabban a légzőszervrendszerben jelentkezik, de szemfertőzést (keratitisz) és fülfertőzést (otitisz) is okozhatnak. Leggyakrabban az *A. fumigatus* okoz megbetegedést, de más *Aspergillus* fajok, mint például *A. flavus*, *A. terreus*, és az *A. niger* fajkomplex tagjai is jelentősek, mint opportunistá humán patogének (Latgé 1999). Nagyon fontos a klinikai *Aspergillus* izolátumok fajszintű meghatározása, mert a különböző fajok eltérő mértékben lehetnek érzékenyek gombaellenes szerekre. A faj ismerete segíthet a megfelelő gombaellenes terápia kiválasztásában. Az *Aspergillus* fajok elkülönítésére különböző módszerek léteznek, de pusztán morfológiai karakterek alapján a pontos meghatározásuk csak néhány faj esetén lehetséges. Molekuláris módszerekkel a fajok meghatározása biztosabb. A β -tubulin vagy kalmódulin gének szekvenciái megfelelően bizonyultak a fajszintű elkülönítéshez.

Munkánk során az Aravind Szemklinikán (Coimbatore, Tamil Nadu, India) 2010-ben illetve 2011-ben keratitiszből izolált, morfológiai jellemzőik alapján az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójába sorolt izolátumokat vizsgáltuk. Elvégeztük az izolátumok szekvencia alapú fajszintű meghatározását, és vizsgáltuk genetikai variabilitásukat és mikotoxin termelő képességüket is.

1.2. A SZEM GOMBÁS MEGBETEGEDÉSEI

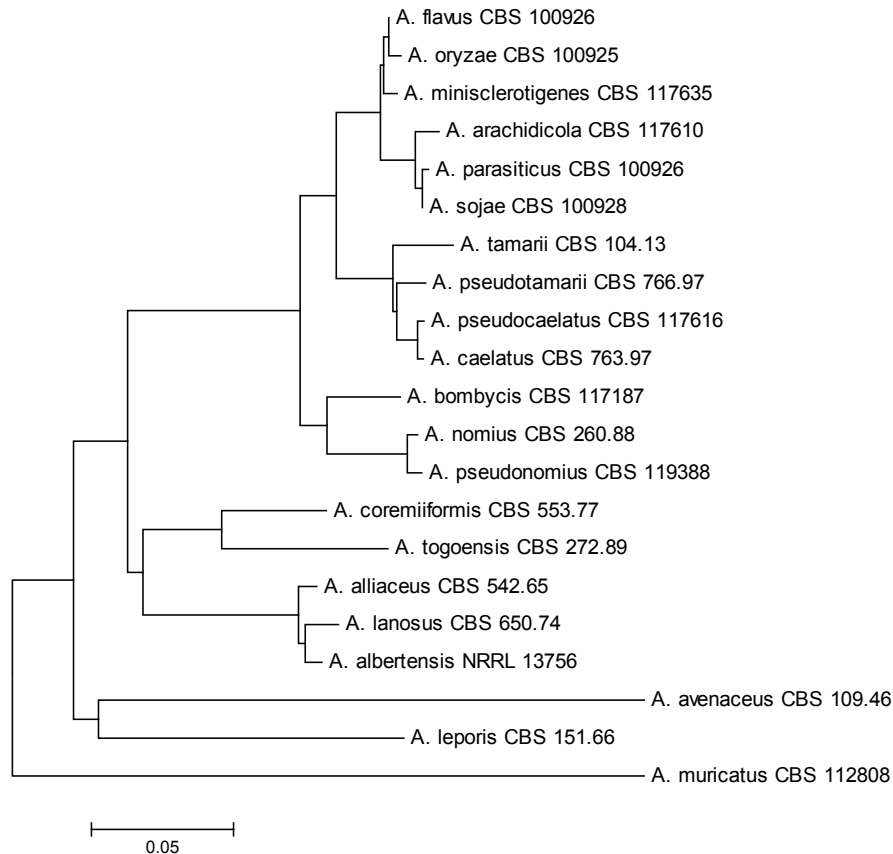
Különféle mikroorganizmusok által okozott fertőzések érinthetik a szem bármelyik részét, de leggyakoribb a szaruhártya megbetegedése (Srinivasan és mtsi 1991). A szaruhártya gyulladását nevezzük keratitisznek. Nem ritka, hogy a fertőzés a szaruhártyán kívül kiterjed a szemhéjra, kötőhártyára, ínhártyára, könnyszervekre, a szemgolyó belső struktúráira vagy a szemüregre. A szem belsejében kialakuló, fertőző ágens okozta, általában gennyes gyulladás az endoftalmitisz. A megbetegedést a legkülönbözőbb mikrobák válthatják ki. A vírusok és baktériumok mellett különösen a trópusi-szubtrópusi országokban a gombák igen jelentős kórokozói a keratitisznek. Leggyakrabban *Candida*, *Fusarium* és *Aspergillus* fajok

mutathatók ki. Ha a kornea fertőzését gombák okozzák, akkor mikotikus keratitisről, vagy keratomikózisról beszélünk. Az *Aspergillus* fajok elsősorban Ázsia és Afrika fejlődő országaiban okoznak egészségügyi, illetve szociális problémákat. Ezekben az országokban, ahol a kétkézi munka és a kevésbé modern eszközök a jellemzőek, az emberek fokozottan ki vannak téve a keratitisz betegségnek. Fontos megjegyezni, hogy ezek a fonalgombák opportunistáknak, azaz sérülés vagy nem megfelelően működő immunrendszer esetén okoznak betegséget. Ép immunrendszerű, megfelelő higiénia körülmények között élő populációban minimális a fertőzés előfordulása. Szaruhártya-sérülést számos tényező kiválthat, például a faágak, a homok, a sár vagy akár a takarmánynövények magjai is összefüggésbe hozhatók a keratitisz fertőzésekkel (Bharathi és mtsi 2002, 2003, 2006, Singh és mtsi 2006, Srinivasan és mtsi 1997, Thomas 2003).

Az *Aspergillus* nemzetségen belül számos fajt azonosítottak, melyek képesek keratomikózist kiváltani. Ezek közül az *A. fumigatus* (Balakrishnan 1961), a fekete *Aspergillus* fajok (Kredics és mtsi 2008) és a *Flavi* szekció tagjai (Manikandan és mtsi 2012) kiemelkedő jelentőségűek.

1.3. AZ ASPERGILLUS NEMZETSÉG FLAVI SEKCIÓJA

Az ide tartozó fajok konídiumainak színe táptalajtól függően változik a sárgászöldtől egészen a barnáig, szkleróciumaik sötét színűek. Több *Flavi* szekcióba tartozó faj termel aflatoxint, melyek közül az aflatoxin B1 a legmérgezőbb a gombák által termelt másodlagos anyagcseretermékek közül. Aflatoxin termelő fajokat azonosítottak már az úgynevezett háziassított fajok közül is, pl *A. oryzae*, *A. tamaris*, *A. sojae*, melyeket a keleti élelmiszer fermentációs folyamatokhoz és a heterológ génexpressziós folyamatokban is hasznosítanak (Campbell-Platt and Cook 1989). Aflatoxint termelő törzsek: *A. flavus*, *A. parasiticus* (Codner és mtsi 1963; Schroeder 1966), *A. nomius* (Kurtzman és mtsi 1987), *A. pseudotamaris* (Ito és mtsi 2001), *A. bombycis* (Peterson és mtsi 2001), *A. toxicarius* (Murakami, 1971; Murakami és mtsi 1982), *A. parvisclerotigenus* (Saito és Tsuruta, 1993, Frisvad és mtsi 2005), *A. zhaoqingensis* (Sun and Qi, 1991), *A. flavus* var. *columnaris* (Van Walbeek és mtsi 1968), *A. minisclerotigenes* és *A. arachidicola* (Pildain és mtsi 2008), valamint az *A. pseudonomius* és *A. pseudocaelatus* (Varga és mtsi 2011, 1. ábra). Ezen fajok közül ez ideig az *A. flavus*-t, *A. tamaris*-t és *A. nomius*-t azonosították, mint humán patogéneket (Hedayati és mtsi 2007, Kredics és mtsi 2007, Manikandan és mtsi 2009).



1. ábra. Az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójába tartozó fajok kalmodulin szekvenciák szomszédösszevonó (neighbor-joining, NJ) analízisén alapuló törzsfája.

1.3.1. *Aspergillus flavus*

Ezen faj izolátumai a meleg, párás, trópusi vagy szubtrópusi területeken általánosan előfordulnak. Változatos elterjedésűek, megtalálhatók különféle mezőgazdasági haszonnövényeken, legyen az a kukorica, földimogyoró vagy akár gyapotmag. Gyakran mutathatók ki kórházi levegőből (Stevens és mtsi 2000) és különböző használati tárgyokról. Telepei zöldesbarna színűek, a konídiumfejek sárgák vagy olajzöld színűek, ezek mérete általában 3-5µm (2. ábra). Szkleróciukai, ha vannak, sötétbarna színűek. A konidiofórok durva felszínűek, kb. 800µm hosszú és 15-20µm széles. Egyszerű pórusú, szeptált hifái vannak.



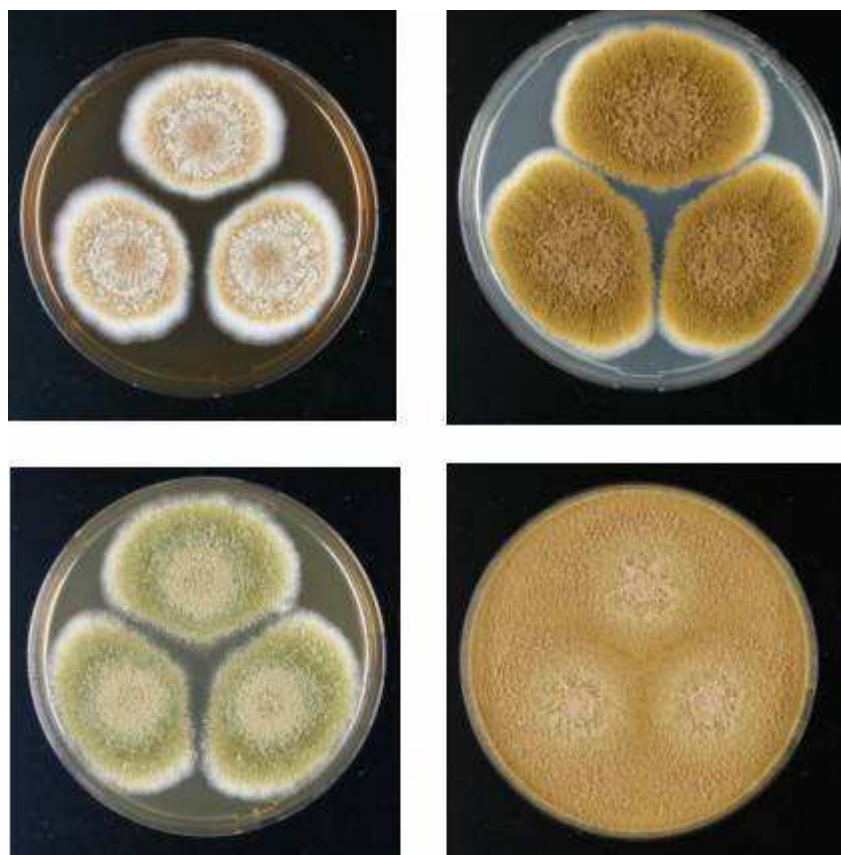
2. ábra. *Aspergillus flavus* telepmorfológiája CYA táptalajon, és egy konídiumtartó mikroszkópos képe.

Az *Aspergillus flavus* a leggyakoribb aflatoxint termelő faj (Sargeant és mtsi 1961). Az *A. flavus* törzsei nagyobb mennyiségben B₁ típusú aflatoxint termelnek (ami a természetben előforduló aflatoxinok közül a legmérgezőbb), kisebb mértékben pedig aflatoxin B₂-t. Mivel kis méretű spórákkal rendelkeznek és 37°C-on is képesek növekedni, emberre és állatra egyaránt patogének lehetnek. Az *A. flavus* általi fertőzés a második legjellemzőbb oka a humán aszpergillózisok különböző formáinak (Pasqualotto és Denning 2008; Hedayati és mtsi 2007; Krishnan és mtsi 2009).

1.3.2. *Aspergillus tamarii*

Legújabb kutatások szerint az *A. tamarii* spórái az allergének fontos forrásai, ugyanis jelen vannak a levegőben (Vermani és mtsi 2010). Legutóbb az *A. tamarii* is felvetődött, mint humán keratitiszt előidéző faj Dél-Indiában (Kredics és mtsi 2007). Egy 32 éves nő 2005. december 27-én a bal szemével a következő panaszokkal fordult orvosához: fájdalom, bőrpír, homályos látás 4 napja. A nő jelezte, hogy 4 nappal korábban szemészeti beavatkozás történt nála, mivel kalapálás közben egy darab vas került a szemébe. A vizsgálatok gombás szálakat mutattak ki. Kioltották burgonya dextróz agarra és 25°C-on inkubálták. Ezek alapján a megjelenése arra utal, hogy az izolátum az *Aspergillus* nemzetségbe sorolható. A betegnél gombaellenes kezelés indult. 3 nap után a beteg bal szemének látásélessége javult, de a szaruhártya még mindig nem volt tökéletes. A beteget felvették a fekvőbetegek közé és folytatták a kezelést, valamint korábbi tanulmányok eredményei alapján ketokonazolt és

flukonazolt kapott. A betegnél a következő 3 hétben javulás volt megfigyelhető, a beszívargás fokozatosan csökkent, az elülső szegmentum gyulladása alábbhagyott. Az utolsó felülvizsgálat során a bal szem elülső szegmensén nebular heg mutatkozott. A betegnek védőszemüveget, valamint a következő 6 hónapon keresztül felülvizsgálatot javasoltak. A mikológiai vizsgálatok során maláta agar lemezre oltották a gombát és *Aspergillus tamarii*-t azonosítottak a telepmorfológia és a mikroszkópos jellemzők alapján (3.ábra). A telepek átmérője 6-7 cm volt. Azonban a tipikus *Aspergillus tamarii* izolátumokkal ellentétben ennek az izolátumnak a konídiumain nem észleltek szemölcsöket, felszínük sima volt. Ez az izolátum jól fejlődött 37°C-on, viszont maláta agaron 42°C-on képtelen volt növekedni.

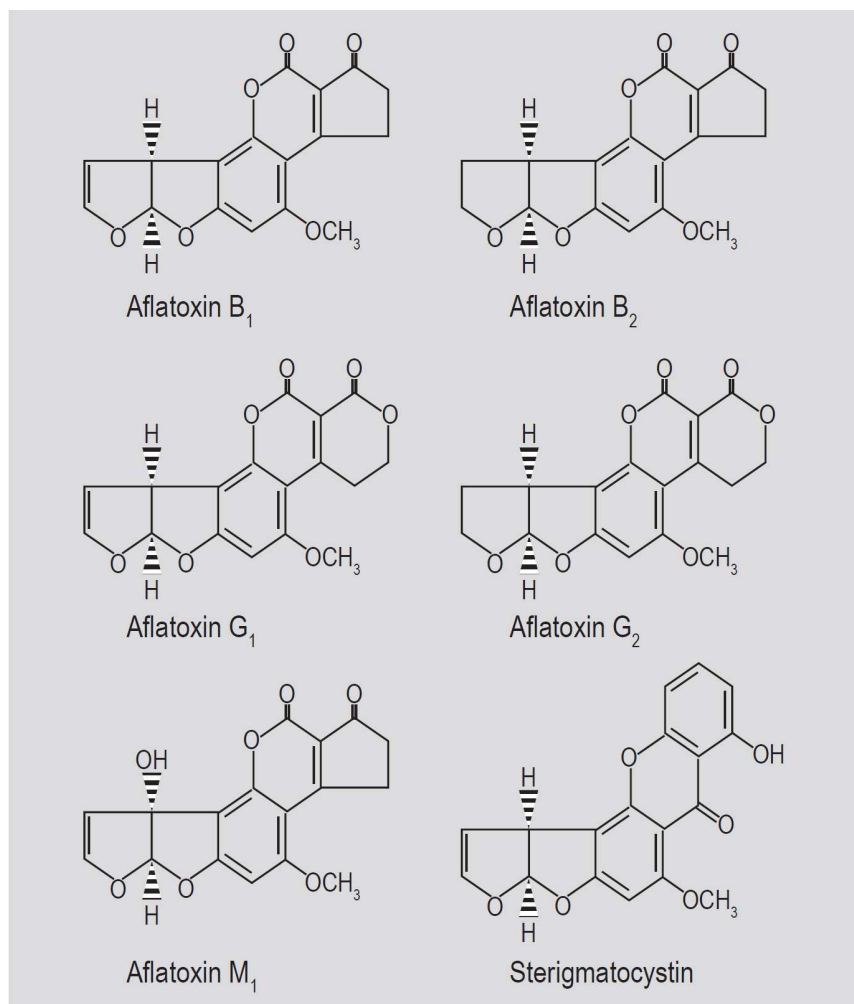


3. ábra. *A. tamarii* telepmorfológiája különböző táptalajokon. Felső sor: AFPA (bal), CYA (jobb). Alsó sor: MEA (bal), YES (jobb)

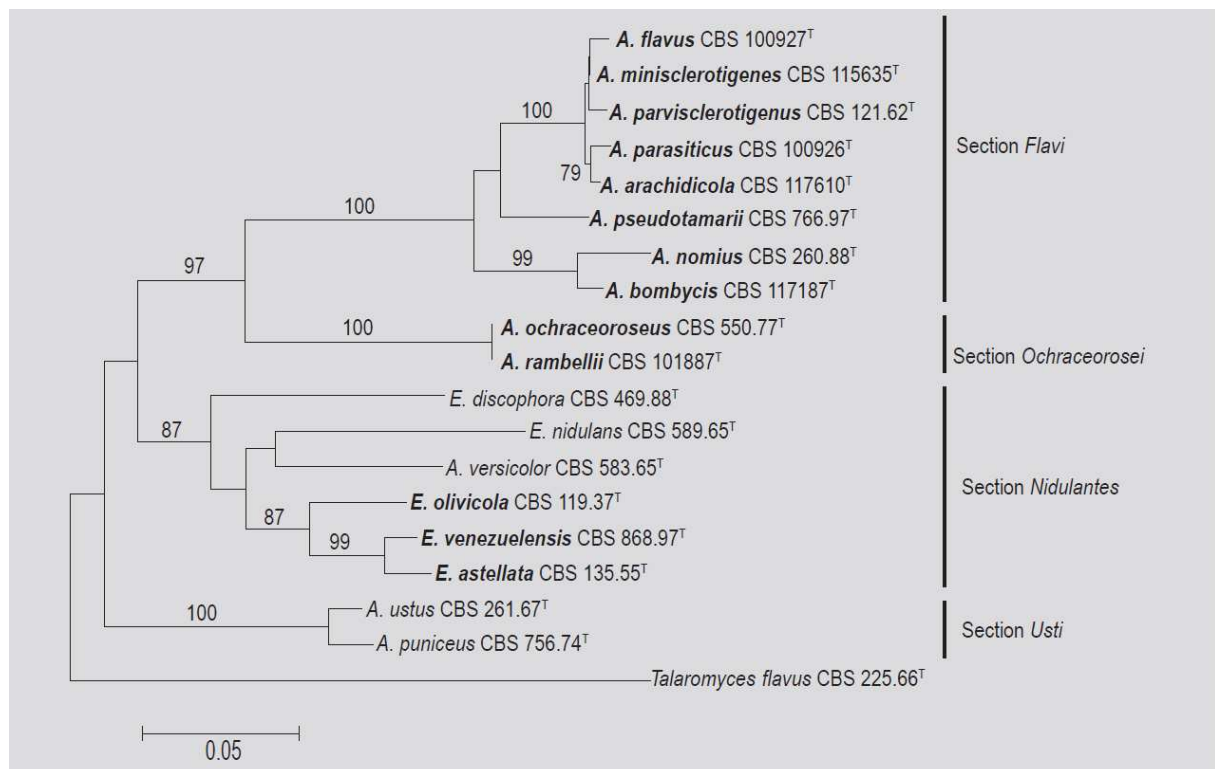
Az *A. nomius*-t 2009-ben írták le, mint humán patogént (Manikandan és mtsi 2009). Ez a faj szintén Indiában idézett elő szaruhártya-gyulladást.

1.4. AFLATOXINOK

Az aflatoxinok deketid eredetű másodlagos anyagcseretermékek, amik komplex bioszintézis útján jönnek létre. Az aflatoxinok gazdaságilag a legfontosabb mikotoxinok (4. ábra). Az aflatoxin B₁ májkárosító tulajdonságú és a legerősebb rákkeltő anyagként emlegetik. Mind ez ideig 15 fajt azonosítottak, mint aflatoxin termelőt, ezek az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. minisclerotigenes*, *A. parvisclerotigenus*, *A. arachidicola*, *A. pseudotamarii*, *A. pseudocaelatus*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudonomius*), *Nidulantes* (*A. olivicola*, *A. venezuelensis*, *A. astellata*) és *Ochraceorosei* (*A. ochraceoroseus*, *A. rambellii*) szekciójába tartoznak.



4. ábra. A különböző típusú aflatoxinok és a sterigmatocisztin szerkezeti képletei (Varga és mtsi 2009)



5. ábra. Aflatoxin termelő fajok β -tubulin szekvenciák filogenetikai analízise révén nyert törzsfája. Az aflatoxin termelők vastagon szedve (Varga és mtsi 2009)

Az aflatoxinok a legalaposabban vizsgált mikotoxinok. Az 1960-as évek elején szennyezett földimogyoró-darát tartalmazó mérgező állati takarmány miatt több, mint 100.000 pulyka pusztult el akut májkárosodásban (turkey X disease; Blout 1961; Sargeant és mtsi 1961; Nesbitt és mtsi 1962; Van der Zijden és mtsi 1962). A toxikus darából egy fonalas gombát is izoláltak, mely szintetikus táptalajon is termelte a toxikus anyagokat. A toxint termelő gombát *Aspergillus flavus*-ként és a mérgező anyagot egy difuranokumarinokkal szerkezetileg rokon vegyületcsoportként azonosították. A vegyület, utalva a termelő gombára az aflatoxin nevet kapta. Az UV-fény alatt mutatott fluoreszcenciájuk és mobilitásuk alapján megkülönböztetünk aflatoxin B₁-et, B₂-t, G₁-et és G₂-t.

Az aflatoxin B₁ a leghatásosabb természetes rákkeltőként ismeretes (Squire 1981) és általában a toxikus törzsek által a leginkább előállított aflatoxin. A fent említetteken kívül több, mint egy tucat egyéb aflatoxint is leírtak, melyek közül az aflatoxin P₁, Q₁, B_{2a} és G_{2a} mint emlős sejtkultúrák által létrehozott biotranszformációs metabolitok ismertek (Heathcote és Hibbert 1978), míg az aflatoxin D₁ ammóniával kezelt kukoricán volt kimutatható (Grove és mtsi 1984). Az aflatoxin B₃ az *A. flavus* metabolitja (Heathcote és Dutton 1969). Az aflatoxin M₁, egy hidroxilált metabolit elsősorban állati szövetekben és folyadékokban (tej, vizelet) fordul

elő, az aflatoxin B₁ metabolikus termékeként. A legtöbb szubsztrát támogatja a növekedést és az aflatoxigenikus formák aflatoxin termelését, természetes szennyeződés a gabonafélékkel, a dióval, olajos magvakkal, fügével, dohányval, stb. fordul elő a leggyakrabban (Bennett és Klich 2003).

Az aflatoxin B₁ hepatotoxikus és hepatokarcinogén hatású, és a leghatásosabb a természetben előforduló karcinogén. Az International Agency for Research on Cancer az aflatoxin B₁-et az elsőszámú karcinogének csoportjába sorolta (IARC 1982). Az aflatoxin fogyasztás okozta betegséget aflatoxikózisnak nevezik. Akut aflatoxikózis alakul ki mérsékelt magas aflatoxin mennyiség elfogyasztása után. Akut esetben a betegség tünetei lehetnek vérzés, akut májkárosodás, ödéma, emésztő szervrendszeri változások, a tápanyagok felszívódásában és/vagy metabolizmusában zavarok, egyes esetekben halálhoz is vezethet.

1.5. AZ *ASPERGILLUS* FAJOK SZAPORODÁSA

Az *Aspergillus* nemzetség, mely egyaránt magába foglal aszexuális és szexuális fajokat, kiváló genetikai alapja a szaporodási módok vizsgálatára gombákban. Az *Aspergillus* fajok szaporodhatnak konídiumokkal ivartalan módon. Emellett mintegy 70 faj képes ivaros úton is szaporodni, homotallikus, vagy heterotallikus minták alapján (Geiser és mtsi 1996). Ezért különösen fontos tanulmányozni az ivaros szaporodást és az *Aspergillus* fajokban a párosodási típus lokusz géneket (mating type – MAT gének).

1.5.1. Genomi bizonyítékok az aszexuális *Aspergillus* fajokban a párosodási képességre

Ellentétben az *A. nidulans*sal, amely meghatározott szexuális ciklussal rendelkezik, bizonyos *Aspergillus* fajokat (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. oryzae* és *A. parasiticus*) hosszú időn át csak aszexuális fejlődést mutatónak tartottak. Mindazonáltal bizonyítékok sora tárta fel, hogy ezen fajok szexuális szaporodásra képesek, vagy ennek lehetősége fennáll.

Először is, több jól ismert aszexuális faj teljes genom szekvenciája (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. oryzae*) azt mutatta, hogy azon gének egész sorát tartalmazzák, melyek az aszkuszos gombák szexuális ciklusának különböző szakaszaival (párosodási folyamat, feromon válasz, meiózis, termőtest kialakítás) kapcsolatban állnak (Galagan és mtsi 2005, Machida és mtsi 2005, Nierman és mtsi 2005, Pel és mtsi 2007, Poggeler 2002)

Két különböző MAT gén funkciója szükséges a szexuális folyamatokhoz ezekben a gombákban: az egyik egy HMG (high-mobility group) domaint hordozó fehérjét, míg a másik

egy alfa box domaint tartalmazó fehérjét kódol. A homotallikus gombák, pl.: *A. nidulans*, mindkét MAT génnel rendelkeznek, melyek különböző kromoszómákra lokalizálódnak (Kronstad 2007, Paoletti és mtsi 2007). Az *A. nidulans* sejteknek képeseknek kell lenniük kifejezni mindkét, MAT1-1 és MAT1-2 gént, hogy önmegtermékenyítők lehessenek. Paoletti és mtsi szerint vagy a MAT1-1 vagy a MAT1-2 génben történő mutáció a termékeny kleisztotéciumok kialakulásának hibájához vezethet (Paoletti és mtsi 2007), tehát mindkét allél szükséges a homotallikus szexuális fejlődéshez.

A heterotallikus gombák izolátumai csak az egyik MAT gént tartalmazzák, és szükséges egy partner, amely a másik gént hordozza. A teljes genom szekvenálás felfedezett egy HMG párosodási típus gént és egy alfa box párosodási típus gént a MAT lókuszbba lokalizálódva az *A. fumigatus*-ban és *A. oryzae*-ban (Galagan és mtsi 2005). Ezen felül további 215 gént találtak az *A. fumigatus* genomjában, melyek potenciális szerepet játszanak a szexuális fejlődés kialakításában (Galagan és mtsi 2005, Nierman és mtsi 2005). Ezen megállapításokat kombinálva a korábbi eredményekkel, megállapítható, hogy az *A. fumigatus* és *A. oryzae* izolátumok tartalmazzák vagy HMG vagy az alfa box párosodási típus gént, de sohasem az intakt kópiáját mindkettőnek, mindezek azt sugallják, hogy ezek heterotallikus fajok (Paoletti és mtsi 2005).

A populációk genetikai vizsgálata során kiderült, hogy a két párosodási típus egyenlően oszlik el világszerte, amely a rekombináció bizonyítékául szolgálhat. Paoletti és mtsi (2005) az egész világról összegyűjtött 290 *A. fumigatus* izolátumot vizsgált párosodási típusuk meghatározására és közel 1:1 arányt észleltek a MAT1-1 és MAT1-2 gének megoszlásában. Egy másik tanulmány is közel 1:1 arányt észlelt a két párosodási típusnál 91 Dublinból származó izolátum esetén (O’Gorman és mtsi 2009). Az *A. fumigatus* izolátumok genetikai variabilitás vizsgálata különböző módszerekkel történt pl.: MLEE (multilocus enzyme electrophoresis), RFLP, RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), SSDP (sequence-specific DNA polymorphism), MLP (microsatellite length polymorphism), és DNS fingerprinting, melyek rekombinációt mutattak ki az *A. fumigatus* természetes populációi között (Paoletti és mtsi 2005, Pringle és mtsi 2005, Varga és Toth 2003.). Az *A. flavus*-ban és *A. parasiticus*-ban a két MAT idiomorf (MAT1-1, MAT1-2) előfordulása közel egyenlő arányú a populációkban, expressziójukat összehasonlítva az mRNS szinttel kimutatható a párosodás típusgének feltételezett funkcionális szerepe ezen növénypatogén gombák szexuális állapotában (Ramirez-Prado és mtsi 2008). Ezen fajokban leírták a szexuális ciklust is a közelmúltban (Horn és mtsi 2009, 2011).

2. CÉLKITŰZÉSEK

- Munkánk során célunk volt az 52 indiai szemfertőzésből származó, morfológiai vizsgálatok alapján az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójába sorolt izolátum fajszerű azonosítása a kalmodulin gén egy szakaszának szekvencia analízise révén.
- Vizsgáltuk az izolátumok genetikai variabilitását, melyet UP-PCR technikával végeztünk el.
- Meghatároztuk az izolátumokban a párosodási típusgének (MAT) eloszlását.
- Az izolátumok aflatoxin termelő képességét vékonyréteg kromatográfiával és HPLC technikával vizsgáltuk.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Felhasznált törzsek

Munkánk során 52 Indiából származó klinikai izolátumot használtunk fel, melyeket keratitiszes esetekből izoláltak (1. táblázat).

Sorszám	Izolátumszám	Fajnév
1	1122/10	<i>A. flavus</i>
2	1257/10	<i>A. flavus</i>
3	802/10	<i>A. flavus</i>
4	1303/10	<i>A. flavus</i>
5	775/10	<i>A. flavus</i>
6	702/10	<i>A. flavus</i>
7	792/10	<i>A. flavus</i>
11	763/10	<i>A. pseudotamaritii</i>
12	711/10	<i>A. flavus</i>
14	-	<i>A. flavus</i>
16	34/11	<i>A. flavus</i>
21	883/10	<i>A. flavus</i>
22	343/11	<i>A. flavus</i>
23	23/11	<i>A. flavus</i>
25	656/10	<i>A. flavus</i>
27	40/11	<i>A. flavus</i>
28	1065/10	<i>A. flavus</i>
29	1023/10	<i>A. flavus</i>
30	177/11	<i>A. flavus</i>
31	28/11	<i>A. flavus</i>
32	929/10	<i>A. flavus</i>
33	875/10	<i>A. flavus</i>
35	67/11	<i>A. flavus</i>
36	1022/10	<i>A. flavus</i>
37	1084/10	<i>A. flavus</i>

39	864/10	<i>A. flavus</i>
40	1333/10	<i>A. flavus</i>
41	1149/10	<i>A. flavus</i>
42	457/11	<i>A. flavus</i>
43	693/10	<i>A. tamaritii</i>
44	800/10	<i>A. flavus</i>
45	1076/10	<i>A. flavus</i>
46	856/10	<i>A. flavus</i>
47	1251/10	<i>A. flavus</i>
48	1083/10	<i>A. flavus</i>
50	1224/10	<i>A. flavus</i>
51	1382/10	<i>A. flavus</i>
52	694/10	<i>A. tamaritii</i>
54	243/11	<i>A. flavus</i>
55	811/10	<i>A. flavus</i>
58	832/10	<i>A. flavus</i>
59	816/10	<i>A. flavus</i>
60	881/10	<i>A. flavus</i>
61	286/11	<i>A. terreus</i>
65	1060/10	<i>A. flavus</i>
66	889/10	<i>A. flavus</i>
68	839/11	<i>A. flavus</i>
70	309/10	<i>A. flavus</i>
71	613/10	<i>A. tamaritii</i>
72	670/10	<i>A. flavus</i>
74	653/10	<i>A. tamaritii</i>
75	101/11	<i>A. flavus</i>

1. táblázat Az 52 felhasznált törzs

3.2. Táptalajok, tápoldatok:

YPD tápoldat: 1%, élesztő kivonat, 1% pepton, 1% glükóz

YPD táptalaj: 1%, élesztő kivonat, 1% pepton, 1% glükóz, 2% agar-agar

MEA (Malátás) táptalaj: 0,5% glükóz, 0,5% élesztőkivonat, 5 ml maláta kivonat, 2% agar-agar

YES tápoldat mikotoxin termeléshez: 2% élesztő, 20% szacharóz

YES táptalaj: 2% élesztő, 20% szacharóz, 2% agar-agar

CYA (Czapek Yeast Extract Agar) táptalaj (Biolab)

AFPA (*Aspergillus flavus* and *parasiticus* Agar) táptalaj (Oxoid)

BHI (Brain Heart Infusion) tápoldat (Oxoid)

RPMT-1640 Medium tápoldat (Sigma)

3.3. Tiszta tenyészet létrehozása:

A mintákat malátás táptalajon tenyésztettük 5 napig 25°C-on inkubátorban, majd YPD ferde agarra oltottuk át, ezeket is 5 napig inkubáltuk 25°C-on, majd 4°C-on tároltuk.

3.4. DNS izolálás

A DNS kivonáshoz a micéliumot 1.5 ml-es mikrocentrifuga csövekben növesztettük. 1 ml YPD tápoldatba 1 oltókacsnyi mintát tettünk a tiszta tenyészetekből, majd 3 napig 25°C-on rázattuk 120-150rpm-en. Az így kapott micéliumtömeget szűrővel választottuk el a tápoldattól.

3.4.1. Felhasznált oldatok, eszközök

Epicentre Biotechnologies® MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit

TAE (1000ml, 50X): 242 g Tris, 51,7 ml 96% ecetsav, 100 ml 0,5 M Na₂EDTA pH 8,0

Agaróz (SeaKem LE)

Mintafelvívő puffer: 6X DNA Loading Dye™ (Fermentas)

SYBR green

Steril bidesztillált víz: Millipore Milli-Q plus 185

A DNS kivonáshoz az Epicentre Biotechnologies® MasterPure™ Yeast DNA Purification készletet használtuk. A protokollban (<http://www.epibio.com/pdftechlit/117pl086.pdf>) javasoltaktól eltértünk abban, hogy a DNS-t nem TE pufferben, hanem 50µl steril bidesztillált vízben vettük fel. Mintáinkat nem kezeltük RNázsal. Kivonatainkat -20°C-on tároltuk. A tömény genomi DNS-t 1%-os agaróz gélen futtattuk meg horizontális gélelektroforézis készülék segítségével. Az agarózt a hígított TAE pufferhez adtuk, és mikrohullámú sütőben addig melegítettük, amíg az agaróz teljesen fel nem oldódott. A fragmentek láthatóvá tételéhez 10µl SYBR green festéket használtunk 100ml gélhez. A mintáinkat 90 voltos feszültséggel futtattuk 15-20 percig. A gélfotók elkészítéséhez az UVP cég BioDoc-It™ géldokumentációs berendezését használtuk.

3.5. Az izolátumok molekuláris azonosítása kalmodulin szekvenciák alapján

3.5.1. Felhasznált oldatok, eszközök

Tízszeres töménységű Double-Taq™ puffer (ZenonBio)
25 mM MgCl₂ Double-Taq™ DNS polimerázhoz (ZenonBio)
Double-Taq™ DNS polimeráz (5u/µl, ZenonBio)
Steril bidesztillált víz: Millipore Milli-Q plus 185
100 mM dNTP oldat (Sigma-Aldrich)
Fermentas GeneRuler™ 100bp DNA Ladder

3.5.2. Cmd5 és Cmd6 indító szekvenciák (Hong és mtsi 2006)

Cmd5: 5'-CCGAGTACAAGGAGGCCTTC-3'
Cmd6: 5'-CCGATAGAGGTCATAACGTGG-3'

3.5.3. A kalmodulin PCR reakcióelegy összetétele

4 µl dNTP oldat (0,2 mM)
4 µl Cmd5 primer
4 µl Cmd6 primer
2 µl Tízszeres töménységű Double-Taq™ puffer (ZenonBio)
3 µl 25 mM MgCl₂ Double-Taq™ DNS polimerázhoz (ZenonBio)
0,2 µl Double-Taq™ DNS polimeráz (ZenonBio)
2 µl Steril bidesztillált víz

1 µl hígított templát DNS

3.5.4. *A kalmodulin PCR program*

A kívánt génszakasz sokszorosítására a Bio-Rad cég MJ Mini Gradient Thermal cycler készülékét használtuk. A reakciót 35 ciklusban hajtottuk végre, lépései a következők voltak:

- 1.) elődenaturáció: 2 perc, 94 °C
- 2.) denaturáció: 30 másodperc, 94 °C
- 3.) hibridizáció: 40 másodperc, 56,5 °C
- 4.) polimerizáció: 45 másodperc, 72 °C
- 5.) utópolimerizáció: 1 perc, 72 °C

A szekvencia file-okat a GeneStudio SeqVerter™ 2.0.4.1 verziószámú változatával fűztük egyetlen FASTA formátumú file-ba, majd ezt a BioEdit programmal szerkesztettük. A filogenetikai analízist a MEGA 4.0 (Tamura és mtsi 2007) programmal végeztük. A filogenetikai fákat neighbor joining (Saitou és mtsi 1987) módszerrel készítettük. Külcsoporként egy *A. nomius* izolátum kalmodulin szekvenciáját alkalmaztuk.

3.6. UP-PCR (universally primed polymerase chain reaction) analízis

Az UP-PCR analízis a RAPD PCR módszerhez hasonlóan alkalmas a genetikai variabilitás vizsgálatára. Itt is random primereket használnak, csak hosszabbakat, mint RAPD esetén (16-21 nukleotid).

3.6.1. *Az alkalmazott primerek (Bulat és mtsi 1994, 2000, Lübeck és mtsi 1998):*

L45	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
AS15inv	5'-CATTGCTGGCGAATCGG-3'
L15/AS19	5'-GAGGGTGGCGGCTAG-3'
L21	5'-GGATCCGAGGGTGGCGGTTCT-3'
AS4	5'-TGTGGGCGCTCGACAC-3'
AS15	5'-GGCTAAGCGGTCGTTAC-3'
FokI	5'-GGATGACCCACCTCCTAC-3'

3.6.2. *Az UP-PCR reakcióelegy összetétele*

2 µl Tízszeres töménységű Double-Taq™ puffer (ZenonBio)

4 µl dNTP oldat (0,2 mM)
2 µl 25 mM-os MgCl₂ Double-TaqTM DNS polimerázhoz (ZenonBio)
5,6 µl primer
5,2 µl Steril bidesztillált víz
0,2 µl Double-TaqTM DNS polimeráz (ZenonBio)
1 µl hígított templát DNS

3.6.3. Az UP-PCR program

A kívánt génszakasz sokszorozására a Bio-Rad cég MJ Mini Gradient Thermal cycler készülékét használtuk. A reakciót 35 ciklusban hajtottuk végre, lépései a következők voltak:

- 1.) elődenaturáció: 2 perc, 94 °C
- 2.) denaturáció: 30 másodperc, 94 °C
- 3.) hibridizáció: 1 perc, 58 °C
- 4.) polimerizáció: 1 perc, 72 °C
- 5.) utópolimerizáció: 1 perc, 72 °C

3.7. Az izolátumok aflatoxin termelő képességének vizsgálata

3.7.1. Aflatoxin extrakció

A vizsgált törzseket 2ml YES tápoldatba oltottuk és 25°C-on, sötétben 5 napig inkubáltuk. Az aflatoxin extrakciót 2ml diklór-metán hozzáadásával végeztük. A szerves fázist mikrocentrifuga csőbe mértük és beszárítottuk.

Az *Aspergillus pseudotamarii* izolátum esetében az emberi szervezethez hasonló körülményeket biztosítva is vizsgáltuk a toxintermelő képességet. 2-2ml BHI és RPMI tápoldatba kioltottuk, melyek imitálják az emberi testnedvek összetételét, majd 10 napig, sötétben, 35°C-on inkubáltuk. Az extrakciót az előzőleg leírtak szerint végeztük.

3.7.2. Vékonyréteg kromatográfia (TLC)

A beszáradt mintákat 40µl kloroformban újra felvettük. Egyenként 10µl mintát vittünk fel CAMAG Linomat 5 mintafelvivő berendezés segítségével a 20x20cm-es TLC szilikagél 60 lapokra (Merck, Darmstadt, Germany).

Standard: Aflatoxin B₁ (1 µg/ml, Sigma)

Futtatóelegyként toluol: etil-acetát: hangyasav 6:3:1 arányú keverékét használtuk. A réteget 25-30 percig futtattuk az elegyben, majd néhány percig hagytuk száradni. UV fénnel (365 nm) történő megvilágítással tettük láthatóvá a sávokat.

3.7.3. HPLC analízis

Az aflatoxin B₁, B₂, G₁ és G₂ analízisét Shimadzu LC-10 moduláris HPLC rendszerrel végeztük, mely egy rendszervezérlőből (SCL-10AVp), automata mintaadagolóból (SIL-10ADVp), két LC-20ADVp pumpából, egy eluens gáztalanítóból (DGU-14A), egy oszloptermosztátból (CTO-10ASVp) és egy fluorescens detektorból (RF-20A) állt. Az elválasztást 35°C-on termosztált reverz fázisú 250mm x 4,6mm-es Prodigy ODS3 (Phenomenex) 5 µm-es szemcseátmérőjű oszlopon, izokratikus eluensárammal valósítottuk meg 1 ml/min áramlási sebességgel. Az A eluens HPLC minőségű víz (Millipore), a B eluens acetonitril és metanol 1:1 arányú elegye volt, a négy mikotoxin elválasztására az A és B eluens 47/53 aránya bizonyult megfelelőnek. A bepárolt és acetonitrilben felvett extraktumokból 5 µl injektáltunk és a fluorescens detektálást 360 nm excitációs és 455nm emissziós hullámhosszaknál valósítottuk meg.

3.8. Az *Aspergillus* izolátumok párosodási típus génjeinek vizsgálata

3.8.1. Felhasznált oldatok, eszközök

Tízszeres töménységű Double-TaqTM puffer (ZenonBio)

25 mM MgCl₂ Double-TaqTM DNS polimerázhoz (ZenonBio)

Double-TaqTM DNS polimeráz (5u/µl, ZenonBio)

Steril bidesztillált víz: Millipore Milli-Q plus 185

100 mM dNTP oldat (Sigma-Aldrich)

Fermentas GeneRulerTM 100bp DNA Ladder

3.8.2. Felhasznált indító szekvenciák (Ramirez-Prado és mtsi 2008)

MAT1 F 5'-ATTGCCCATTTGGCCTTGAA-3'

MAT1 R 5'-TTGATGACCATGCCACCAGA-3'

MAT2 F 5'-GCATTCATCCTTTATCGTCAGC-3'

MAT2 R 5'-GCTTCTTTTCGGATGGCTTGCG-3'

3.8.3. A PCR reakcióelegy összetétele

- 10 µl Master Mix
- 4 µl forward primer
- 4 µl reverse primer
- 1 µl hígított templát DNS

3.8.4. A PCR program

A kívánt génszakasz sokszorosítására a Bio-Rad cég MJ Mini Gradient Thermal cycler készülékét használtuk. A reakciót 35 ciklusban hajtottuk végre, lépései a következők voltak:

MAT1-1 esetén:

- 1.) elődenaturáció: 3 perc, 94 °C
- 2.) denaturáció: 30 másodperc, 94 °C
- 3.) hibridizáció: 15 másodperc, 50 °C
- 4.) polimerizáció: 25 másodperc, 72 °C
- 5.) utópolimerizáció: 1 perc, 72 °C

MAT1-2 esetén:

- 1.) elődenaturáció: 3 perc, 94 °C
- 2.) denaturáció: 30 másodperc, 94 °C
- 3.) hibridizáció: 15 másodperc, 70 °C
- 4.) polimerizáció: 25 másodperc, 72 °C
- 5.) utópolimerizáció: 1 perc, 72 °C

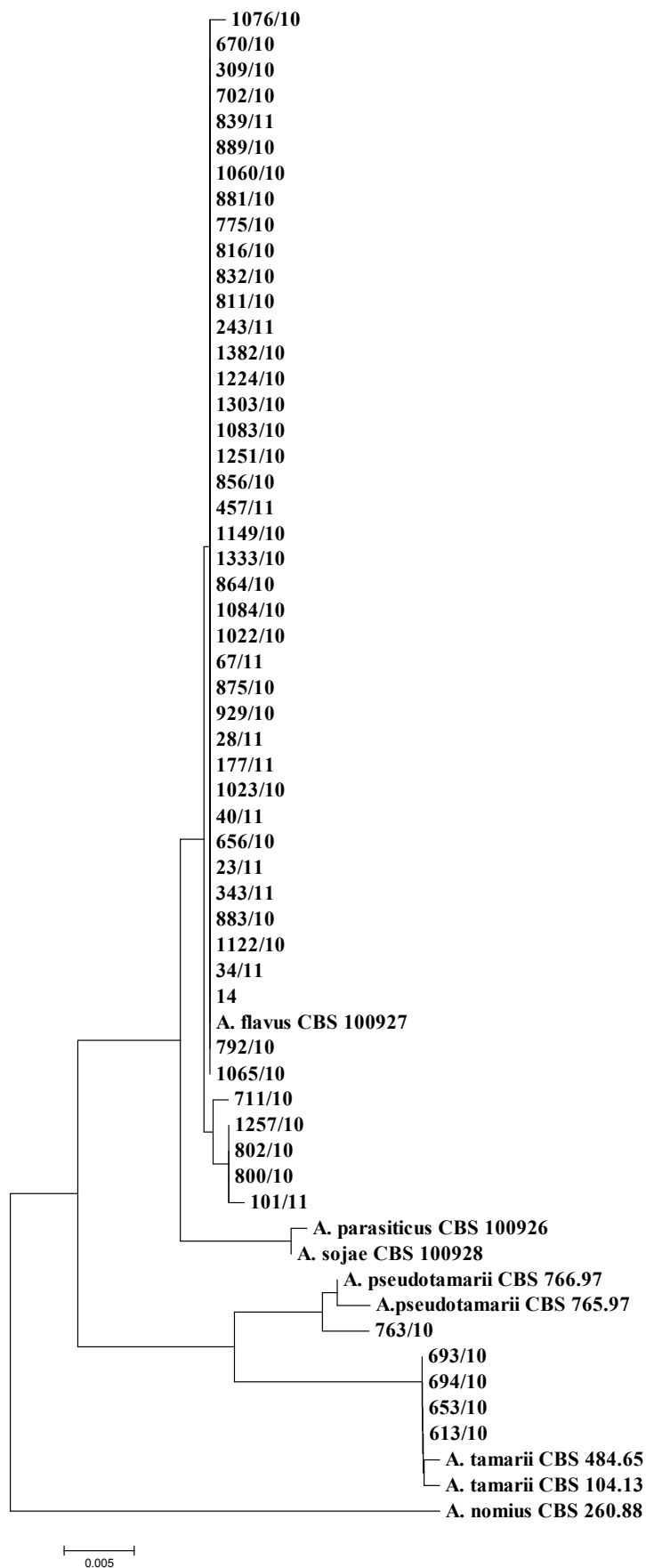
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

4.1. AZ IZOLÁTUMOK FAJSZINTŰ AZONOSÍTÁSA

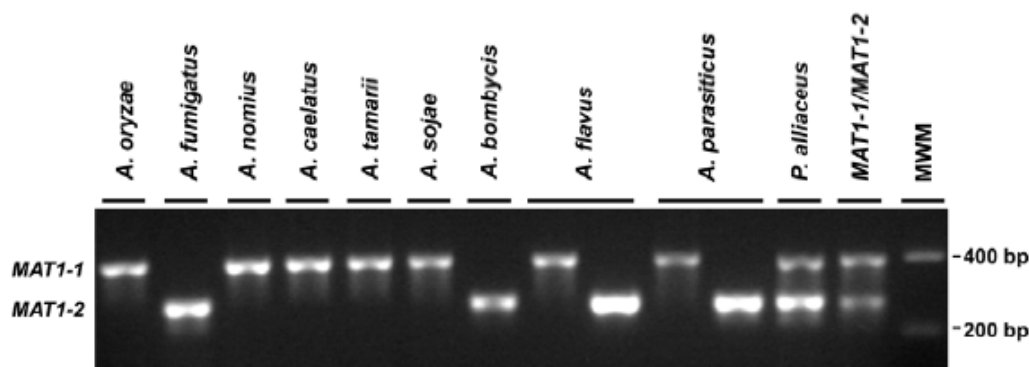
Munkánk során 52 indiai szemfertőzésből származó, morfológia alapján *A. flavus*-ként azonosított izolátumot vizsgáltunk. A kalmodulin gén egy szakaszának amplifikálása és szekvencia analízise révén végeztük el az izolátumok fajszerű azonosítását. Ez a régió korábban megfelelőnek bizonyult a *Flavi* szekció fajainak elkülönítésére (Varga és mtsi 2011). A törzsfa készítésénél 493 nukleotidnyi DNA szakaszokat vontunk be, a filogenetikai analízist a szomszéd-összevonó (neighbor-joining) módszerrel végeztük (6. ábra). A vizsgált izolátumok kalmodulin szekvencia adatok alapján 4 fajba tartoztak: 46 az *A. flavus*, 4 az *A. tamarii*, míg 1-1 az *A. pseudotamarii* és *A. terreus* fajok tagjai. Az *A. flavus* és *A. tamarii* izolátumok aránya hasonló egy korábbi indiai tanulmányban észleltekkkel, ahol a 200 vizsgált izolátum közül 150 az *A. flavus*, míg 7 az *A. tamarii* fajba tartozott (Manikandan és mtsi 2012).

4.2. AZ *ASPERGILLUS* IZOLÁTUMOK PÁROSODÁSI TÍPUS GÉNJEINEK VIZSGÁLATA

Az 52 indiai klinikai izolátum párosodási típusának meghatározását specifikus primerpárokkal végzett PCR reakcióval végeztük el. A MAT1-1 primerpárral 396bp méretű fragmentet vártunk, míg MAT1-2 primerpárral 270bp méretűt (7. ábra, Ramirez-Prado és mtsi 2008). Az elvégzett kísérletek eredményeként megállapítottuk, hogy minden általunk vizsgált izolátum csak a MAT1-1 idiomorfot hordozta.



6. ábra. A szemfertőzésekből származó izolátumok és a konspecifikus fajok típustörzseinek kalmodulin szekvencia adatok neighbor-joining analízise alapján létrehozott törzsfája.



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

4.3. AZ *ASPERGILLUS PSEUDOTAMARII* IZOLÁTUM JELLEMZŐI

Elsőként azonosítottuk az *A. pseudotamarii*-t mint humán kórokozót. Ezt a fajt Ito és mtsi (2001) írták le mint aflatoxin termelő fajt a *Flavi* szekción belül.

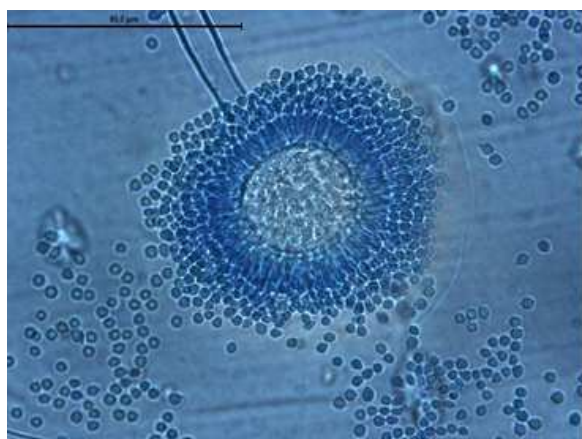
A faj morfológiai jellemzői: A telepek CYA táptalajon 7 nap alatt 25°C-on 6-7cm átmérőjűek lettek, 42°C-on a spórák nem csíráztak. A kolóniák felületén bőségesen álló konídium fejek találhatók. A konídium fejek színe narancssárgás barnától a világosbarnáig változik az érett kultúrákban. A telepek halvány sárgásbarnák, azonos színű diffundáló pigment látható az agar táptalajon. A szkleróciumok sötétbarnák vagy feketék, gömb alakúak, 1-2mm átmérőjűek. A konídiumfejek gömb alakúak, 500-770µm átmérőjűek (9. ábra). A telepek MEA táptalajon 6-7cm átmérőjűek, a konídium fejek olajzöldek. Az *A. pseudotamarii* izolátum telepmorfológiája táptalajtól függően változik. Az erről készült csészefotókat a 8. ábra mutatja.



8. ábra. Az *A. pseudotamarii* telepmorfológiája különböző táptalajokon.

felső sor: YES táptalajon (balra), MEA táptalajon(jobbra)

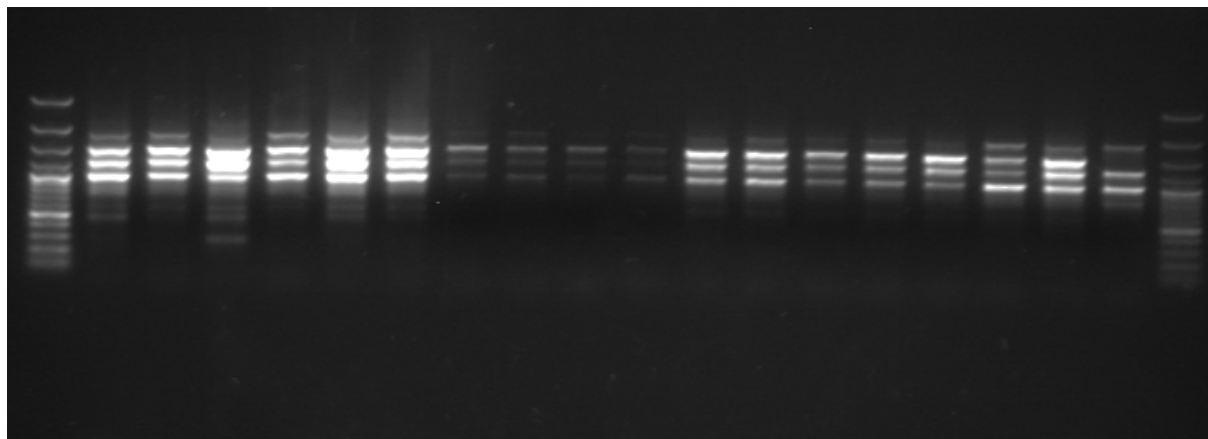
alsó sor: CYA táptalajon (balra), AFPA táptalajon (jobbra)



9. ábra. Az *A. pseudotamarii* konídiumtartók és konídiumok mikroszkópos képe.

4.4. AZ IZOLÁTUMOK GENETIKAI VARIABILITÁSÁNAK VIZSGÁLATA

Az *A. flavus* izolátumok kismértékű változékonyságot mutattak összevetve a korábban vizsgált kukoricáról származó izolátumokkal (Török 2011). A UP-PCR analízist 35 *A. flavus* izolátummal végeztük, kulcsoportként a 694/10 jelzésű *A. tamarii*-t alkalmaztuk. A 10. ábrán egy UP-PCR reakció eredményét bemutató gélfotó látható, a reakciót a 3-2 jelzésű primerrel végeztük el.

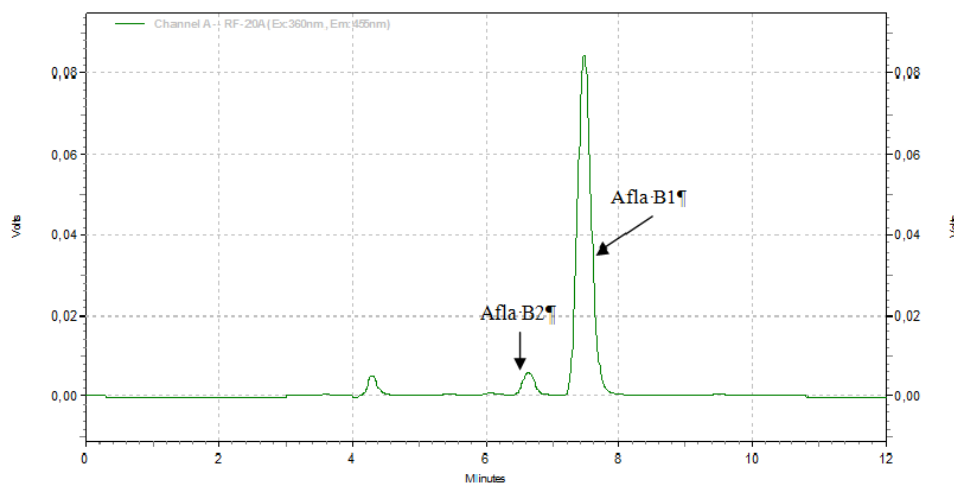


10. ábra. UP-PCR gélfotó a 3-2 jelzésű primerrel

A minták sorrendje balról jobbra: 100bp-os DNS létra, 1022/10, 1084/10, 864/10, 1333/10, 1149/10, 457/11, 800/10, 856/10, 1251/10, 1083/10, 1224/10, 1382/10, 243/11, 811/10, 832/10, 816/10, 1060/10, 694/10, 100bp-os DNS létra.

4.5. AZ IZOLÁTUMOK AFLATOXIN TERMELŐ KÉPESSÉGÉNEK VIZSGÁLATA

Az *Aspergillus pseudotamarii* izolátum aflatoxin termelő képességének vizsgálatát három különböző tápközegben végeztük el. Mivel klinikai izolátum, ezért a YES tápoldat mellett, megpróbáltunk az emberi szervezethez hasonló körülményeket teremteni. Így RPMI és BHI tápközegben is elvégeztük a tenyésztést, 35°C-os inkubációs hőmérsékleten. Ennek eredményeként megállapítottuk, hogy az izolátum csak YES tápoldatban termelt aflatoxin B₁-et és B₂-t, összhangban az irodalmi adatokkal (Varga és mtsi 2009). Az extraktumokat előzetesen vékonyrétegen futtattuk, majd az eredményeket HPLC-vel ellenőriztük (11. ábra). Az izolátum 2.6ng/ml aflatoxin B₂-t, és mintegy 1002 ng/ml aflatoxin B₁-et termelt.



11. ábra. Az *Aspergillus pseudotamarii* izolátum által YES tápoldaton termelt aflatoxinok HPLC kromatogramja

Az *Aspergillus flavus* izolátumok aflatoxin termelő képességét csak YES tápoldaton vizsgáltuk. Az extraktumok aflatoxin tartalmát ebben az esetben is előzetesen vékonyréteg kromatográfiával ellenőriztük. Azokat az izolátumokat, amelyek toxintermelőnek bizonyultak, vizsgáltuk tovább HPLC-vel és megállapítottuk a termelt aflatoxinok mennyiségét (2. táblázat).

Mintas szám	Izolátum szám	Aflatoxin B ₂ (ng/ml)	Aflatoxin B ₁ (ng/ml)
1	1122/10	34,8	59,2
2	1257/10	0	0
4	1303/10	49,2	437
5	775/10	67,6	1584,2
6	702/10	34	83,6
7	792/10	52,8	715,2
12	711/10	2357,2	75330,8
14	14	0	0
16	34/11	34,4	50,2
21	883/10	186,4	4674,2
22	343/11	58,4	868,8
23	23/11	352	14766,2
28	1065/10	35	63,8
30	177/11	39,4	68,6
35	67/11	37,8	245
41	1149/10	64	1135,2
45	1076/10	35,4	75,8
46	856/10	231,4	5406,6
47	1251/10	108,6	1352,4
50	1224/10	210,2	2996,8
51	1382/10	48	743,4
55	811/10	35	65,4
58	832/10	68,6	2966,8
65	1060/10	105	2029
72	670/10	50	442,8

2. táblázat Az *A. flavus* izolátumokban mért aflatoxin értékek

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Különféle mikroorganizmusok által okozott fertőzések érinthetik a szem bármelyik részét, de leggyakoribb a szaruhártya megbetegedése. A szaruhártya gyulladását keratitisnek nevezzük. Ilyen megbetegedést számos mikroorganizmusok kiválthatnak, például az *Aspergillus* fajok is. Leggyakrabban az *A. fumigatus* okoz megbetegedést, de más *Aspergillus* fajok, mint például *A. flavus*, *A. terreus*, és az *A. niger* fajkomplex tagjai is jelentősek, mint opportunista humán patogének. Nagyon fontos a klinikai *Aspergillus* izolátumok fajsztípus meghatározása, mert a különböző fajok eltérő mértékben lehetnek érzékenyek gombaellenes szerekre. Az *Aspergillus* nemzetség *Flavi* szekciójának tagjai aflatoxin termelő képességük mellett klinikai szempontból is jelentősek. Munkánk során 52 Indiából származó, előzetes morfológiai vizsgálatok alapján az *A. flavus* fajba sorolt, szemfertőzésekből származó klinikai izolátum fajmeghatározását végeztük el a kalmodulin gén egy szakaszának PCR technikával történő amplifikálása, majd szekvenciájának meghatározása révén. Ennek eredményeként a következő fajeloszlást kaptuk: 46 izolátum az *A. flavus*, 4 az *A. tamarii*, míg 1-1 izolátum az *A. terreus* és *A. pseudotamarii* fajba tartoztak. Az *A. pseudotamarii*-t elsőként sikerült azonosítanunk mint humán patogén szervezetet. Vizsgáltuk az izolátumok genetikai variabilitását UP-PCR technikával. Az *A. flavus* izolátumok kis mértékű változékonyságot mutattak összevetve a korábban vizsgált kukoricáról származó izolátumokkal. Vizsgáltuk az *Aspergillus* izolátumok párosodási típus génjeit (MAT) is. Valamennyi *A. flavus*, *A. tamarii* és *A. pseudotamarii* izolátum a MAT-1 idiomorfot hordozta. Az izolátumok aflatoxin termelő képességét vékonyréteg kromatográfiás, illetve HPLC módszerrel vizsgáltuk. A legtöbb *A. flavus* izolátum és az *A. pseudotamarii* izolátum termelt mind aflatoxin B₁-et, mind B₂-t YES tápoldatban. Az izolátumok antifungális szerekkel szembeni érzékenységeinek vizsgálata folyamatban van.

6. IRODALOM

- Balakrishnan, M.S. 1961. Reproduction in some Indian red algae and their taxonomy. Proceedings of the Symposium on Algology 45: 828.
- Bennett, J.W. and Klich, M.A. 2003. Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews 16: 497-516.
- Bharathi, M.J., Ramakrishnan, R., Vasu, S., Meenakshi, R. and Palaniappan, R. 2003. Epidemiological characteristics and laboratory diagnosis of fungal keratitis. A three-year study. Indian Journal of Ophthalmology 51: 315-321.
- Bharathi, M.J., Ramakrishnan, R.R., Meenakshi, R.R., Mittal, S.S., Kumar, C.S. and Srinivasan, M.M. 2006. Microbiological Diagnosis of Infective Keratitis: Comparative Evaluation of Direct Microscopy and Culture Results. British Journal of Ophthalmology 90: 1271-1276.
- Bharathi, M.J., Ramakrishnan, R.R., Vasu, S., Meenakshi, R. and Palaniappan, R. 2002. Aetiological diagnosis of microbial keratitis in South India - A study of 1618 cases. Indian Journal of Medical Microbiology 20: 19-24.
- Campbell-Platt, G. and Cook, P.E. 1989. Fungi in the production of foods and their ingredients. Journal of Applied Bacteriology 67: S117-S131.
- Codner, R.C., Sargeant, K. and Yeo, R. 1963. Production of aflatoxin by the culture of strains of *Aspergillus flavus-oryzae* on sterilized peanuts. Biotechnology and Bioengineering 5: 185-192.
- Cohen, J., Denning, D.W., Viviani, M.A. 1993. Epidemiology of invasive aspergillosis in European cancer centres. EORTC Invasive Fungal Infections Cooperative Group. European Journal of Clinical Microbiology and Infectectious Diseases 12: 392-393.
- Frisvad, J.C., Skouboe, P. and Samson, R.A. 2005. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology 28: 442-453.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.-J., Wortman, J.R., Batzoglou, S., Lee, S.-I., Basturkmen, M., Spevak, C.C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Scazzocchio, C., Farman, M., Butler, J., Purcell, S., Harris, S., Braus, G.H., Draht, O., Busch, S., D'Enfert, C., Bouchier, C., Goldman, G.H., Bell-Pedersen, D., Griffiths-Jones, S., Doonan, J. H., Yu, J., Vienken, K., Pain, A., Freitag, M., Selker, E.U., Archer, D.B.,

- Penalva, M.A., Oakley, B.R., Momany, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Asai, K., Machida, M., Nierman, W.C., Denning, D.W., Caddick, M., Hynes, M., Paoletti, M., Fischer, R., Miller, B., Dyer, P., Sachs, M.S., Osmani, S.A. and Birren, B.W. 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438:1105–1115.
- Geiser, D.M., Timberlake, W.E. and Arnold, M.L. 1996. Loss of meiosis in *Aspergillus*. *Mol. Biol. Evol.* 13:809–817.
- Grove, M.D., Plattner, R.D. and Peterson, R.E. 1984. Detection of aflatoxin D1 in ammoniated corn by mass spectrometry-mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* 48: 887-889.
- Heathcote, J.G. and Dutton, M.F. 1969. New metabolites of *Aspergillus flavus*. *Tetrahedron* 25: 1497-1500.
- Heathcote, J.G. and Hibbert, J.R. 1978. Aflatoxins: chemical and biological aspects. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, the Netherlands, 212 pp.
- Hedayati, M., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P. and Denning, D.W. 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153: 1677-1692.
- Horn, B.W., Moore, G.G. and Carbone, I. 2011. Sexual reproduction in aflatoxin-producing *Aspergillus nomius*. *Mycologia* 103:174–183.
- Horn, B.W., Ramirez-Prado, J.H. and Carbone, I. 2009. The sexual state of *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia* 101:275–280.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1982. The evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. IARC Monograph Supplement 4. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 292 pp.
- Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D.T. and Goto, T. 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycological Research* 105: 233-239.
- 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.
- Kredics, L., Varga, J., Kocsubé, S., Dóczy, I., Samson, R.A., Rajaraman, R., Narendran, V., Bhaskar, M., Vágvölgyi, C. and Manikandan, P. 2007. Case of keratitis caused by *Aspergillus tamarii*. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 3464-3467.

- Krishnan, S., Manavathu, E.K. and Chandrasekar, P.H. 2009. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. *Mycoses* 52: 206–222.
- Kronstad, J.W. 2007. Self-fertility: the genetics of sex in lonely fungi. *Curr. Biol.* 17:R843–R845.
- Kurtzman, C.P., Horn, B.W. and Hesseltine, C.W. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 53:147-158.
- Latgé, J.P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews* 12:310–350.
- Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K.-I., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D.W., Galagan, J.E., Nierman, W.C., Yu, J., Archer, D.B., Bennett, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Fedorova, N.D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P.R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J.-I., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J.R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N. and Kikuchi, H. 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 438:1157–1161.
- Manikandan, P., Varga, J., Kocsubé, S., Anita, R., Revhati, R., Németh, T.M., Narendran, V., Vágvolgyi, C., Panneerselvam, 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* (in press)
- Manikandan, P., Varga, J., Kocsubé, S., Samson, R.A., Anita, R., Revathi, R., Dóczi, I., Németh, T.M., Narendran, V., Vágvolgyi, C., Manoharan, C. and Kredics, L. 2009. Mycotic keratitis due to *Aspergillus nomius*. *Journal of Clinical Microbiology* 47:3382-3385.
- Murakami, H. 1971. Classification of the koji mould. *Journal of General and Applied Microbiology* 17:281-308.
- Murakami, H., Hayashi, K. and Ushijima, S. 1982. Useful key characters separating three *Aspergillus* taxa: *A. flavus*, *A. parasiticus* and *A. flavus*. *Journal of General and Applied Microbiology* 28:55-60.

- Nesbitt, B.F., O'Kelly, J., Sargeant, K. and Sheridan, A. 1962. *Aspergillus flavus* and Turkey X disease: toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature* 195:1062-1063.
- Nierman, W.C., Pain, A., Anderson, M.J., Wortman, J.R., Kim, H. S., Arroyo, J., Berriman, M., Abe, K., Archer, D.B., Bermejo, C., Bennett, J., Bowyer, P., Chen, D., Collins, M., Coulsen, R., Davies, R., Dyer, P.S., Farman, M., Fedorova, N., Fedorova, N., Feldblyum, T.V., Fischer, R., Fosker, N., Fraser, A., Garcia, J.L., Garcia, M.J., Goble, A., Goldman, G.H., Gomi, K., Griffith-Jones, S., Gwilliam, R., Haas, B., Haas, H., Harris, D., Horiuchi, H., Huang, J., Humphray, S., Jimenez, J., Keller, N., Khouri, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Konzack, S., Kulkarni, R., Kumagai, T., Lafon, A., Latge, J.P., Li, W., Lord, A., Lu, C., Majoros, W.H., May, G.S., Miller, B.L., Mohamoud, Y., Molina, M., Monod, M., Mouyna, I., Mulligan, S., Murphy, L., O'Neil, S., Paulsen, I., Penalva, M.A., Perteu, M., Price, C., Pritchard, B.L., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Rawlins, N., Rajandream, M.A., Reichard, U., Renauld, H., Robson, G.D., Rodriguez de Cordoba, S., Rodriguez-Pena, J.M., Ronning, C.M., Rutter, S., Salzberg, S.L., Sanchez, M., Sanchez- Ferrero, J.C., Saunders, D., Seeger, K., Squares, R., Squares, S., Takeuchi, M., Tekaia, F., Turner, G., Vazquez de Aldana, C.R., Weidman, J., White, O., Woodward, J., Yu, J.H., Fraser, C., Galagan, J.E., Asai, K., Machida, M., Hall, N., Barrell, B. and Denning, D.W. 2005. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438:1151–1156.
- Paoletti, M., Seymour F.A., Alcocer M.J.C., Kaur N., Calvo A.M., Archer D.B. and Dyer P. S. 2007. Mating type and the genetic basis of selffertility in the model fungus *Aspergillus nidulans*. *Curr. Biol.* 17:1384–1389.
- Pasqualotto, A.C. and Denning, D.W. 2008. An aspergilloma caused by *Aspergillus flavus*. *Medical Mycology* 46: 275-278.
- Peterson, S.W., Ito, Y., Horn, B.W. and Goto, T. 2001. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia* 93: 689-703.
- Pildain, M.B., Frisvad, J.C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J. and Samson, R.A. 2008. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 725-735.
- Poggeler, S. 2002. Genomic evidence for mating abilities in the asexual pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Genet.* 42:153–160.

- Pringle, A., Baker D.M., Platt J.L., Wares J.P., Latge J.P. and Taylor J.W. 2005. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Evolution* 59:1886–1899.
- Ramirez-Prado, J.H., Moore, G.G., Horn, B.W. and Carbone, I. 2008. Characterization and population analysis of the mating-type genes in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genetics and Biology* 45: 1292-1299.
- Saito, M., Tsuruta, O. 1993. A new variety of *Aspergillus flavus* from tropical soil in Thailand and its aflatoxin productivity. *Proceedings of the Japanese Association of Mycology* 37: 31-36.
- Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelley, J. and Carnaghan, R.B.A. 1961. Toxicity associated with certain samples of groundnut. *Nature* 192: 1096-1097.
- Schroeder, H.W. 1966. Effect of corn steep liquor on mycelial growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. *Applied Microbiology* 14: 381-385.
- Singh, G., Manikandan, P., Bhaskar, M., Revathi, R., Narendran, K., Kour, A. and Narendran, V. 2006. Multivariate analysis of childhood microbial keratitis in South India. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 35: 185-189.
- Squire, R.A. 1981. Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach. *Science* 214: 877-880.
- Srinivasan, M., Gonzales, C.A., George, C., Cevallos, V., Mascarenhas, J.M., Asokan, B., Wilkins, J., Smolin, G. and Whitcher, J.P. 1997. Epidemiology and aetiological diagnosis of corneal ulceration in Madurai, south India. *British Journal of Ophthalmology* 81: 965-971.
- Srinivasan, R., Kanungo, R. and Goyal, J.L. 1991. Spectrum of oculomycosis in South India. *Acta Ophthalmol.* 69:744–749.
- Stevens, D.A., Kan, V.L., Judson, M.A., Morrison, V.A., Dummer, S., Denning, D.W., Bennet, J.E., Walsh, T.J., Patterson, T.F. and Pankey, G.A. 2000. Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. *Clin. Infect. Dis.* 30:696-709.
- Sun, Z.M. and Qi, Z.T. 1991. A new aflatoxin producing species of sect. *Flavi* of *Aspergillus*. *Acta Mycologica Sinica* 10: 22-26.
- Thomas, P.A. 2003. Current perspectives on ophthalmic mycoses. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 730-797.
- Török, M. 2011. Kukoricapatogén *Aspergillus flavus* genetikai variabilitásának vizsgálata. *Biológus Diplomamunka. Szegedi Tudományegyetem.*

- van de Vondervoort, P.J.I., Poulsen, B.R., Ruijter, G.J.G., Schuleit, T., Visser, J. and Iversen, J.J.L. 2004. Isolation of a fluffy mutant of *Aspergillus niger* from chemostat culture and its potential use as a morphologically stable host for protein production. *Biotechnol. Bioeng.* 86:301–307 221.
- O’Gorman, C. M., H. T. Fuller, and P. S. Dyer. 2009. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 457:471–474.
- Van der Zijden, A.S.M., Blanceh Koelensmid, W.A.A., Boldingh, J., Barrett, C.B., Ord, W.O. and Philp, J. 1962. *Aspergillus flavus* and Turkey X disease: isolation in crystalline form of a toxin responsible for Turkey X disease. *Nature* 195: 1060-1062.
- Van Walbeek, W., Scott, P.M. and Thatcher, F.S. 1968. Mycotoxins from some food-borne fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 14: 131-137.
- Varga, J., Frisvad, J.C., Pildain, M.B., Vaamonde, G., Cabral, D., Samson, R.A. 2011. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Stud Mycol.* 69 (1): 57-80.
- Varga, J., and Toth, B. 2003. Genetic variability and reproductive mode of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Genet. Evol.* 3:3–17.
- Vermani, M., Vijayan, V.K., Menon, B., Kausar, M.A., and Agarwal, M.K. 2010. Physico-chemical and clinico-immunologic studies on the allergenic significance of *Aspergillus tamarii*, a common airborne fungus. *Immunobiology* 216 (3): 393-401.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Prof. Vágvolgyi Csaba Tanszékvezető Úrnak, hogy dolgozatomat a Mikrobiológia Tanszéken készíthettem.

Köszönöm témavezetőimnek, Dr. Varga Jánosnak és Baranyi Nikolettnek, hogy szaktudásukkal segítették munkámat, valamint a rám fordított időt, figyelmet, türelmet és hasznos tanácsokat. Köszönöm Dr. Szekeres Andrásnak a HPLC analízisben nyújtott segítségét.

Köszönet illeti továbbá az SZTE TTIK Mikrobiológia Tanszékének összes munkatársát a segítőkészségükért.

NYILATKOZAT

Alulírott Samu Aliz, Biológia szakos hallgató, kijelentem, hogy a TDK dolgozatban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel. A HPLC analíziseket Dr. Szekeres András végezte.

Aláírás:

Dátum: 2012.04.16.