

Obecność w powietrzu atmosferycznym grzybów z gatunku *Fusarium culmorum* i ich oporność na antymikotyki – hipotetyczne zagrożenie dla zdrowia ludzi

The presence of airborne *Fusarium culmorum* and its resistance to antimycotics – hypothetical risk to human health

Katarzyna Wolny-Koładka (a, b, c, d, e)

Katedra Mikrobiologii, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
Kierownik Katedry Mikrobiologii: dr hab. inż. M.J. Chmiel. Rektor: prof. dr hab. inż. W. Sady

(a) koncepcja pracy i zaplanowanie badań

(b) pobór próbek i analizy mikrobiologiczne

(c) analiza i opracowanie wyników

(d) przygotowanie publikacji

(e) korekta publikacji przed złożeniem do druku

STRESZCZENIE

Wstęp. W powietrzu atmosferycznym obecne są zarodniki grzybów z rodzaju *Fusarium*, mogące posiadać oporność na stosowane w medycynie leki przeciwgrzybicze. Celem pracy było określenie wrażliwości na wybrane antymikotyki oraz wyznaczenie MIC (minimalnego stężenia hamującego) dla szczepów należących do gatunku *F. culmorum*.

Materiał i metody. Szczepy grzybów wyizolowano z powietrza atmosferycznego pobranego w sąsiedztwie pól na których uprawiano pszenicę ozimą. Ocenę wrażliwości na leki przeciwgrzybicze przeprowadzono z zastosowaniem pasków E-test.

Wyniki. Wszystkie izolaty odznaczały się opornością w stosunku do ketokonazolu, itraconazolu i flukonazolu. MIC dla: amfoterycyny B wynosiło $0,023 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, dla worykonazolu $0,016 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, dla pozakonazolu $0,006 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ oraz dla kaspofunginy $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Wśród badanych izolatów było 8 opornych na worykonazol, 3 oporne na pozakonazol i 10 opornych na amfoterycynę B.

Wnioski. Badane grzyby były w różnym stopniu wrażliwe na testowane antymikotyki. Najsilniejsze działanie grzybobójcze stwierdzono w przypadku: pozakonazolu, worykonazolu i amfoterycyny B. W powietrzu atmosferycznym obecne są szczepy z gatunku *F. culmorum* posiadające naturalną oporność na niektóre antymikotyki.

Słowa kluczowe: *Fusarium culmorum*, antymikotyki, oporność, powietrze

ABSTRACT

Introduction. In the atmospheric air, fungal spores of the genus *Fusarium* are present which may be resistant to antifungal drugs used in medicine. The aim of this study was to determine the sensitivity to selected antimycotics, and to identify the MIC (minimum inhibitory concentration) for strains belonging to the species *F. culmorum*.

Material and methods. Fungal strains were isolated from atmospheric air sampling in the vicinity of fields where winter wheat was cultivated. Evaluation of susceptibility to antifungal drugs was carried out using E-test strips.

Results. All isolates were characterized by resistance to ketoconazole, itraconazole and fluconazole. MIC for amphotericin B was $0.023 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, for voriconazole $0.016 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, for posaconazole $0.006 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ and for caspofungin $0.25 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Among the isolates tested, 8 were resistant to voriconazole, 3 resistant to posaconazole and 10 resistant to amphotericin B.

Conclusions. The examined strains presented different sensitivity to antifungal drugs. The strongest fungicidal activity was found in the case of: posaconazole, voriconazole and amphotericin B. In the atmospheric air there may exist strains of *F. culmorum* which have natural resistance to some antimycotics.

Key words: *Fusarium culmorum*, antimycotics, resistance, air

WSTĘP

Mykotoksynotwórcze grzyby fitopatogeniczne z rodzaju *Fusarium* są jednymi z najczęściej izolowanych patogenów roślin uprawnych tj. pszenica, żyto, kukurydza, jęczmień i ziemniaki [1, 2]. Stanowią także duże zagrożenie dla ludzi, wywołując zakażenia grzybicze oraz produkując mykotoksyny [3, 4]. Zarodniki *Fusarium* spp. są także izolowane z powietrza atmosferycznego, za pośrednictwem którego mogą przemieszczać się na dalekie odległości [5, 6]. Mimo, że powietrze atmosferyczne nie jest środowiskiem przyjaznym dla rozwoju grzybów, to bytując w nim, w dalszym ciągu zachowują swój potencjał infekcyjny [5, 7]. Źródłem zarodników grzybów z rodzaju *Fusarium* znajdujących się w powietrzu atmosferycznym jest grzybnia, która rozwija się min. na porażonych roślinach, magazynowanych płodach rolnych, czy też w glebie [1]. Osoby oddychające powietrzem zawierającym zarodniki grzybów narażone są na różnego rodzaju choroby [8, 9]. Grzyby z rodzaju *Fusarium* są jednymi z najczęściej izolowanych patogenów pszenicy ozimej, której areał upraw z roku na rok rośnie. Dlatego można założyć, że powietrze znajdujące się w sąsiedztwie upraw pszenicy będzie silnie zanieczyszczone zarodnikami grzybów z rodzaju *Fusarium* [10, 11]. W dalszym ciągu nie mamy dostatecznych informacji na temat lekooporności szczepów izolowanych ze środowiska, które mogą wywoływać zakażenia u ludzi [12]. Dlatego niezwykle istotne jest określenie profilu lekooporności szczepów *Fusarium* spp. izolowanych z powietrza znajdującego się w sąsiedztwie upraw pszenicy ozimej.

Celem przedstawionej pracy było określenie, czy środowiskowe szczepy *F. culmorum*, izolowane z powietrza atmosferycznego posiadają oporność na wybrane antymikotyki. Ponadto, celem analiz było wyznaczenie MIC (minimalne stężenie hamujące) dla wszystkich analizowanych szczepów *F. culmorum*.

MATERIAŁ I METODY

W analizie wykorzystano szczepy grzybów należące do gatunku *F. culmorum* wyizolowane z powietrza atmosferycznego pobranego w sąsiedztwie pól na których uprawiano pszenicę ozimą. Pobór próbek powietrza wykonywano pięciokrotnie w lipcu 2014 r. w tygodniowych odstępach czasu, podczas trwających żniw w województwie małopolskim. Termin i miejsce poboru próbek wybrano nieprzypadkowo. Grzyby z rodzaju *Fusarium* w tym gatunek *F. culmorum* jest powszechnie występują-

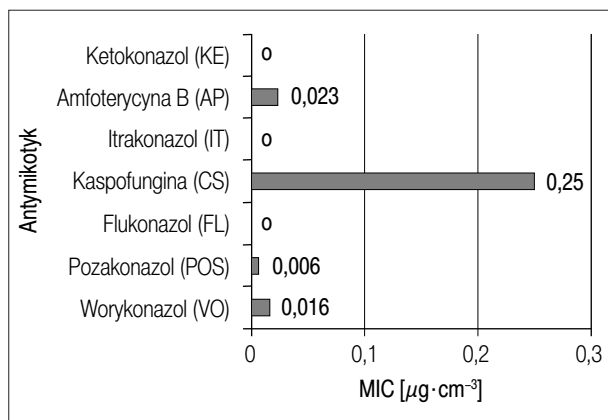
cym na zbożach patogenem [1]. Stąd można założyć, że w momencie intensywnych prac polowych, liczba zarodników tych grzybów w powietrzu będzie wysoka, co może stanowić zagrożenie dla pracujących przy żniwach osób.

Zastosowano impaktor MAS-100 (Merck) [13, 14] oraz podłoże PDA (agar glukozowo-ziemniaczany, Biocorp) w celu izolacji grzybów z rodzaju *Fusarium*. Grzyby wyizolowane z powietrza zidentyfikowano w oparciu o klucze diagnostyczne [15-17]. Izolaty zakwalifikowane do gatunku *F. culmorum* przeszczepiono na podłoże PDA i poddano dalszym analizom. Do oceny lekowrażliwości przeznaczono 63 szczepy należące do gatunku *F. culmorum*. Wrażliwość izolatów środowiskowych badano z użyciem 7 antymikotyków: ketokonazol, amfoterycyna B, itrakonazol, kaspofungina, flukonazol, pozakonazol i worykonazol. W celu oznaczenia poziomu drażliwości badanych szczepów na wybrane leki przeciwgrzybicze wykorzystano metodę z użyciem pasków antymikotykowych (E-test, bioMerieux). Metoda ta jest stosowana powszechnie w laboratoriach diagnostycznych w celu oznaczania drażliwości mikroorganizmów na antybiotyki oraz do wyznaczania MIC (minimalne stężenie hamujące) [18, 19]. Na podłoże Agar RPMI (Biocorp) posiewano przy pomocy jałowej wymazówki zawiesinę badanych szczepów grzybów. Zawiesina została sporządzona w soli fizjologicznej i miała gęstość 0,5 w skali McFarlanda. Na tak przygotowane podłoże wkładano paski E-test, hodowle inkubowano w 35°C przez 24–48 h (aż do uzyskania wzrostu). Po tym czasie odczytywano minimalne stężenia hamujące wzrost grzybów z gatunku *F. culmorum*.

WYNIKI BADAŃ

Wszystkie testowane izolaty z gatunku *F. culmorum* odznaczały się 100% opornością na działanie ketokonazolu, itrakonazolu oraz flukonazolu. Najniższe wartości MIC względem badanych grzybów wykazały antymikotyki: pozakonazol – 0,006 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, worykonazol – 0,016 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ oraz amfoterycyna B – 0,023 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Kaspofungina hamowała wzrost *F. culmorum* przy MIC równym 0,25 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (ryc. 1).

Kaspofungina była antymikotykiem, który w bardzo różnicowany sposób działał na badane grzyby. W zgromadzonej puli izolatów 24 były drażliwe, a 39 odporne na kaspofunginę. Na podstawie przeprowadzonych badań do leków przeciwgrzybiczych o najsilniejszym działaniu zakwalifikowano: pozakonazol, worykonazol i amfoterycynę B (tab. I).



Ryc.1. Minimalne stężenia hamujące (MIC) wybranych antymikotyków dla izolatów *F. culmorum*

Fig. 1. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of the selected antimycotics to *F. culmorum* isolates

Tabela I. Procentowy udział izolatów *F. culmorum* wrażliwych oraz opornych na badane antymikotyki

Table I. The percentage of *F. culmorum* isolates sensitive and resistant to antimycotics used in the study

Lp.	Antymikotyk	S (Wrażliwe)	R (Oporne)
1.	Ketokonazol (KE)	0 (0%)	63 (100%)
2.	Amfoterycyna B (AP)	53 (84%)	10 (16%)
3.	Itrakonazol (IT)	0 (0%)	63 (100%)
4.	Kaspofungina (CS)	24 (38%)	39 (62%)
5.	Flukonazol (FL)	0 (0%)	63 (100%)
6.	Pozakonazol (POS)	60 (95%)	3 (5%)
7.	Worykonazol (VO)	55 (87%)	8 (13%)

Na podstawie uzyskanych wyników można ustalić następujący szereg antymikotyków pod względem malejącej siły ich działania: pozakonazol > worykonazol > amfoterycyna B > kaspofungina > ketokonazol, itrakonazol, flukonazol

DYSKUSJA

W pracy dokonano oceny wpływu wybranych antymikotyków na wzrost grzybów z gatunku *F. culmorum* izolowanych z powietrza atmosferycznego. Do testów wybrano 7 antymikotyków stosowanych w leczeniu zakażeń wywoływanych przez grzyby. Testom poddano następujące leki przeciwgrzybicze: ketokonazol, amfoterycyna B, itrakonazol, kaspofungina, flukonazol, pozakonazol i worykonazol. Zgromadzone izolaty należące do gatunku *F. culmorum* odznaczały się 100% opornością na działanie ketokonazolu, itrakonazolu oraz flu-

konazolu. Pozakonazol odznaczał się najsilniejszym grzybobójczym działaniem, hamując wzrost izolatów już przy MIC równym $0,006 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Ponadto, w stosunku do tego antymikotyku najmniej izolatów było opornych (5%). Kolejnymi silnie działającymi antymikotykami były: worykonazol, MIC równe $0,016 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ i amfoterycyna B, MIC równe $0,023 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Kaspofungina hamowała wzrost *F. culmorum* przy MIC wynoszącym $0,25 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, jednakże w stosunku do tego antymikotyku zaobserwowano największe zróżnicowanie we wrażliwości poszczególnych izolatów. Jak pokazują badania własne oraz innych autorów [12, 20–26], silne działanie bójcze względem *Fusarium* spp. wykazują: amfoterycyna B, worykonazol i pozakonazol, co zostało potwierdzone w niniejszej pracy. Również w przypadku ketokonazolu, itrakonazolu i flukonazolu stwierdzona w badaniach własnych oporność testowanych grzybów na te antymikotyki znajduje potwierdzenie w badaniach innych autorów [12, 27–30]. Kaspofungina była antymikotykiem, który w zróżnicowany sposób działał na testowane izolaty. W badaniach własnych 24 (38%) izolaty *F. culmorum* było wrażliwych, a 39 (62%) było opornych na ten lek. Podobne wyniki uzyskano w stosunku do szczepów z gatunku *F. graminearum* izolowanych z kłosów zbóż, gdzie 16 (32%) izolatów było wrażliwych, a 34 (68%) było opornych na działanie kaspofunginy [12]. Użyte w badaniach własnych szczepy środowiskowe izolowano z powietrza atmosferycznego, a nie od leczonych farmakologicznie pacjentów. Dlatego nie można było przewidzieć jaki profil lekooporności in vitro będą prezentować testowane izolaty. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że badane grzyby posiadają naturalną oporność na niektóre antymikotyki. Jest to zjawisko niepokojące i wymagające monitoringu. Izolaty *F. culmorum* obecne w powietrzu, oporne na leki przeciwgrzybicze mogą bowiem przedostawać się na dalekie odległości i stanowić zagrożenie dla zdrowia ludzi.

WNIOSKI

1. Szczepy z gatunku *F. culmorum* izolowane z powietrza prezentują zróżnicowaną wrażliwość na testowane antymikotyki.
2. Najsilniejsze działanie grzybobójcze wykazały: pozakonazol, worykonazol i amfoterycyna B.
3. W powietrzu atmosferycznym znajdują się izolaty *F. culmorum* posiadające naturalną oporność na wybrane antymikotyki.

Źródło finansowania: praca została sfinansowana ze środków przeznaczonych na działalność statutową Katedry Mikrobiologii Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie.

PIŚMIENICTWO

- [1] Leslie J.F., Summerell B.A.: The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Pub. Prof. first ed. USA. 2006.
- [2] Suchorzyńska M., Misiewicz A.: Mikotoksynotwórcze grzyby z rodzaju *Fusarium* i ich wykrywanie technikami PCR. *Post Mikrobiol* 2009; 48(3): 221-230.
- [3] Dignani M.C., Anaissie E.: Human fusariosis. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 167-175.
- [4] Dzierżanowska D., Dąbkowska M., Garczewska B.: Patomechanizm i obraz kliniczny zarażeń grzybiczych. Grzybyce narządowe. *Med Prakt* 2003; 7-12.
- [5] Ogórek R., Płaskowska E.: Analiza mikologiczna powietrza wybranych pomieszczeń użytku publicznego. *Doniesienia wstępne. Mikol Lek* 2011; 18(1): 24-29.
- [6] Kaczmarek J., Brachaczek A., Jędrzycka M.: Monitorowanie występowania w powietrzu zarodników grzybów rodzaju *Fusarium* jako narzędzie wspierające ochronę pszenicy przed fuzariozą kłosów. *Prog Plant Prot/Post Ochr Roślin* 2012; 52(4): 1016-1019.
- [7] Kaiser K., Wolski A.: Kontrola czystości mikrobiologicznej powietrza. *Technika Chłodnicza i Klimatyzacyjna*. 2007; 4: 158-162.
- [8] Piotrowska M., Gutarowska B., Żakowska Z.: Toksynotwórczość grzybów pleśniowych towarzysząca korozji biologicznej w obiektach budowlanych. IX Sympozjum Naukowo-Techniczne. Ochrona obiektów budowlanych przed wilgocią, korozją biologiczną i ogniem. Jubileusz 80-lecia profesora Jerzego Ważnego. Wrocław-Zakopane, 18-20 października 2007 r.
- [9] Mędrala-Kuder E.: Analiza porównawcza zanieczyszczenia mikologicznego powietrza atmosferycznego i powietrza mieszkań prawidłowo eksploatowanych. Krajowa Konferencja „Zdrowy dom”, Warszawa 1993.
- [10] Jaczewska-Kalicka A.: Zmienność strat plonu pszenicy ozimej powodowanych przez choroby grzybowe w latach 1996-1999. *Prog Plant Prot/Post Ochr Roślin* 2000; 40(2): 623-625.
- [11] Jaczewska-Kalicka A.: Grzyby patogeniczne dominujące w uprawie pszenicy ozimej w latach 1999-2001. *Acta Agrobot* 2002; 55(1): 89-96.
- [12] Wolny-Koładka K.: Ocena oporności szczepów z gatunku *Fusarium graminearum* na wybrane antymikotyki. *Mikol Lek* 2013; 20(4): 125-127.
- [13] PN-Z-04111/03.: Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby grzybów mikroskopowych w powietrzu atmosferycznym (imisja) przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną. 1989.
- [14] PN-Z-04008/08.: Ochrona czystości powietrza. Pobieranie próbek powietrza atmosferycznego (imisja) do badań mikrobiologicznych metodą aspiracyjną i sedymentacyjną. 1989.
- [15] Kwaśna H., Chełkowski J., Zajkowski P.: Grzyby (Mycota), tom XXII. Sierpik (*Fusarium*). Polska Akademia Nauk, Flora Polska, Warszawa 1991.
- [16] Macura A.B.: Diagnostyka grzybów. Część II. Diagnostyka grzybów pleśniowych. *Diagnosta Lab* 2008; 3(18): 4-5.
- [17] Marcinowska J.: Oznaczanie rodzajów grzybów ważnych w patologii roślin. Fundacja rozwój SGGW, Warszawa 2003.
- [18] Bala M., Ray K., Gupta S.M.: Comparison of disc diffusion results with minimum inhibitory concentration (MIC) values for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*. *Indian J Med Res* 2004; 122:48-51.
- [19] Drew W.L., Barry A.L., O'Toole R. i wsp.: Reliability of the Kirby-Bauer Diffusion Method for Detecting Methicillin-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol* 1972; 24(2): 240-247.
- [20] Dupont B.: Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *J Antimicrob Chemother (Suppl A)* 2002; 49: 31-36.
- [21] Dzierżanowska D.: Leki przeciwgrzybicze stosowane w leczeniu grzybic układowych. Zakażenia grzybicze – wybrane zagadnienia. A-Medica Press, Bielsko-Biała 2006: 92-125.
- [22] Jeu L., Piacenti F.J., Lyakhovetskiy A.G. i wsp.: Voriconazole. *Clin Ther* 2003; 25: 1321-1381.
- [23] Martino R., Viscoli C.: Empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent or recurrent fever of unknown origin. *B J Haematol* 2005; 132: 138-154.
- [24] Perfect J.R., Marr K.A., Walsh T.J. i wsp.: Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infection. *Clin Infect Dis*. 2003. 36: 1122-1131.
- [25] Rizzato G.: Zakażenia grzybicze u pacjentów po przeszczepie: rola liposomalnej postaci Amfoterycyny B w erze nowych leków przeciwgrzybiczych. *Sarcoidosis Vasc Lung Dis*. 2004; 21: 3-20.
- [26] Walsh T.J., Pappas P., Winston D.J. i wsp.: Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. *N Engl J Med* 2002; 346: 225-234.
- [27] Pujol I., Guarro J., Gené J. i wsp.: In-vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. *Strains. J Antimicrob Chemother* 1997; 39:163-167.
- [28] Lalitha P., Shapiro B.L., Srinivasan M. i wsp.: Antimicrobial susceptibility of *Fusarium*, *Aspergillus*, and other filamentous fungi isolated from keratitis. *Arch Ophthalmol* 2007; 125(6): 789-93.
- [29] Sekhon A.S., Padhye A.A., Garg A.K. i wsp.: In vitro sensitivity of medically significant *Fusarium* species to various antimicrobials. *Chemotherapy* 1994; 40(4): 239-44.
- [30] Lewis R.E., Wiederhold N.P., Klepser M.E.: In Vitro Pharmacodynamics of Amphotericin B, Itraconazole, and Voriconazole against *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(3): 945-951.

Adres do korespondencji:

Katarzyna Wolny-Koładka
Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
al. Mickiewicza 24/28
30-059 Kraków
telefon: 12 662 40 96
e-mail: k.wolny@ur.krakow.pl