

***Proteus morganii* törzsek szerológiai keresztkapcsolatai**

PhD értekezés tézisei

Dr. Péterfi Zoltán

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Szolcsányi János

Programvezető: Prof. Dr. Emódy Levente

Témavezető: Dr. Kocsis Béla



**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet
2007**

1. BEVEZETÉS

A szervezetet veszélyeztető, behatoló kórokozókkal szemben fajlagos antitestek termelődnek, amelyek képesek a pathogen kórokozóhoz kapcsolódni és azok eliminációjában részt venni. A kórokozó felismerése nem mindig tökéletes. A hasonló vagy azonos antigént hordozó mikroorganizmusok is immunreakciót adnak ezen ellenanyagokkal. Ilyen esetekben szerológiai **keresztreakcióról** beszélhetünk, mivel az egyik, antigénként viselkedő mikroba ellen termelt antitest kapcsolódik egy másik mikroba felszínén levő antigénnel is.

A keresztreakcióban résztvevő antigének ismerete segítséget nyújthat mind az identifikálásban, mind pedig érzékenyebb diagnosztikai módszerek kidolgozásában. Ezen kívül a tiszta antigének kinyerésével, az azok szintézisét meghatározó genetikai háttér és immunológiai tulajdonságuk felderítésével hatékony védőoltásokat dolgozhatunk ki, akár több kórokozóval szemben is. „Oltóanyagként” adott esetben akár a nem kórokozó baktériumot is használhatjuk, amennyiben ez megfelelő minőségű, úgynevezett protektív antitest termelését kiváltó antigént tartalmaz.

Korábban a *Proteus morganii* törzsekkel végzett szerológiai vizsgálatok bizonyították, hogy egyes szerocsoportok nagyfokú keresztreakciót mutatnak a genuson belüli más szerocsoportokkal vagy a *Proteus* genuson kívüli egyéb Gram-negatív baktériumokkal is. Évtizedekkel ezelőtt Prof. Rauss Károly, Ralovich Béla és Vörös Sándor úttörő munkát folytattak egyes keresztkapcsolatok jellegének tisztázásában. Ezek a munkálatok az akkori immunológiai módszereket használták és csőagglutinációs vizsgálatokon alapultak, amelynél ma már érzékenyebb eljárások állnak rendelkezésre. Akkor mind **lipopoliszacharid (LPS)** (hőstabil), mind **fehérje természetű (hőlabilis)** keresztreakció igazolódott a *P. morganii* O34 (8662/64)-*E. coli* O111 között.

Ezen ismereteket felhasználva érdemesnek látszott a keresztkapcsolatok modern és érzékeny módszerekkel történő megerősítése, valamint a kialakításukban résztvevő antigének, azok kémiai szerkezeti és immunológiai tulajdonságainak tanulmányozása.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Gram-negatív baktériumok szerológiai keresztreakcióinak jelenlétét és az O antigének kémiai hasonlóságát már többen leírták, azonban ezidáig csupán három esetben bizonyították, hogy az O antigén két rendszertanilag távol álló baktériumtörzs esetében egyforma, éspedig *E. coli* O111 és *S. enterica* O35, *E. coli* O55 és *S. enterica* O50, valamint *E. coli* O157 és *S. enterica* O30 eseteiben. Prof. Rauss Károly, Ralovich Béla és Vörös Sándor ugyan már korábban (1967) leírt keresztkapcsolatot az általunk vizsgált *Proteus* és más baktériumok között, de a keresztreakció hátterének, az antigének szerkezetének meghatározása akkor nem történt meg.

A fenti kérdések tisztázására irányuló munkánkat a következőképpen csoportosíthatjuk:

1. **Metodikai fejlesztés** az LPS ELISA érzékenységének és fajlagosságának növelésére, hogy alkalmas legyen finom antigén különbségek detektálására is.
2. A továbbfejlesztett módszer **klinikai** használhatóságának **kipróbálása**.
3. A keresztreakcióban résztvevő **antigének tisztított** formában való **kinyerése és azonosítása**.
4. A korábban leírt szerológiai **keresztkapcsolatok megerősítése, pontosítása**.
5. A hőstabil (**LPS**) antigének cukor **szerkezetének feltárása és összehasonlítása**.
6. **Genetikai hasonlóság detektálása** a három vizsgált törzs *rfb* gén clusterében
7. A keresztreakcióban résztvevő hőlabilis (**fehérje**) antigén **identifikálása**.
8. Annak vizsgálata, hogy a keresztreakáló antigének képesek-e **keresztvédelem kiváltására** és a keresztreakciók kihasználhatók-e a vakcinológia területén.
9. A további tudományos, kísérleti munka során használható **lehetőségek feltárása**.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Felhasznált baktériumok:

Proteus morgani O34 (8662/64) O1, O9 és O43, *Escherichia coli* O21, O22, O33, O61, O68 és O111, *Salmonella* Urbana O30, *Salmonella* Adelaide O35, *Yersinia enterocolitica* O9, *Shigella sonnei* fázis I, II, Re 4350, *Bacteroides fragilis*.

A baktériumtenyésztést Mueller-Hinton táptalajon Biostat U 30 típusú fermentorban (pH 7,2; 37°C) végeztük. Az így nyert, kb. 700 g nedves baktériumot acetonnal szárítottuk. Az LPS kivonása az S baktériumokból **fenol-vizes**, míg az R baktériumokból **fenol-kloform-petroléteres eljárással** történt. A *Bacteroides fragilis* LPS RIBI Immunochem Research Inc., (Hamilton, Montana, USA) adománya volt.

A külső membrán kivonathoz a baktériumokat 2000 ml Mueller-Hinton táptalajban tenyésztettük (24 h, 37°C, 100 rpm). A külső membrán fehérjék kivonása Osborn és munkatársai által leírt módszer szerint történt. Grádiens ultracentrifugálás után a különböző frakciókat deionizált vízben oldva -20°C-on fagyaszta tároltuk.

3.2. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE):

A gélelektroforézis BioRad Mini-Protean II (BioRad Laboratories, Hercules, Ca, USA) készüléssel Laemmli discontinuus rendszerben történt. A fehérjék festése Laemmli, míg az LPS ezüstözése Hancock és munkatársai szerint leírtak alapján történt.

3.3. Poliklonális immunsavók előállítása nyúlban:

Az immunizáláshoz használt baktériumot 37°C-on, egy éjszakán keresztül tenyésztettük. Az előállított megfelelő sűrűségű baktérium szuszpenziót egy órán át főztük, majd az Új-Zéland-i nyulakat (kb. 3 kg) intravénásan oltottuk.

A külső membrán proteinek elleni immunsavót szintén nyulakban termeltük. A kipreparált külső membrán fehérjéket SDS-PAGE segítségével választottuk szét, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk. Ezt követően a megfelelő sávokat kivágtuk, DMSO-ban oldottuk. Az oldat és komplett Freund adjuváns egyenlő arányú keverékével immunizáltunk.

3.4. Csőagglutináció:

1:100 hígítású immunsavóból 10 Widal csőben felező hígítást készítettünk, majd 25 µl főzött (100 °C, 60 perc) baktérium szuszpenziót ($A_{600}=1.2$) adtunk hozzá. Az eredmények leolvasása agglutinoscop segítségével történt.

3.5. Indirekt hemagglutináció:

Mosott vagy konzervált vörösvértest szuszpenzióból centrifugálással (2000 rpm, 5 perc) nyert üledék 0,5 ml-éhez adtuk az előzőleg 2 ml fiziológiás konyhasóban szuszpendált 3 mg LPS-t és vízfürdőben egy órát 37°C-on, inkubáltuk majd háromszor mostuk. A vizsgálandó savóból Takátsy lemezen fiziológiás konyhasóval kettős léptékű tova futó hígítást végeztünk. Az eredményeket 10 órás inkubáció után olvastuk le.

3.6. ELISA:

Először az Engvall és Perlmann által leírt, később a Takahashi és munkatársai által módosított módszert használtuk ELISA módszerünk alapjául. A módszer továbbfejlesztése a következőképpen történt:

A lemez előérzékenyítése: 100 µl, 0,01 M, 7,2 pH-jú foszfát pufferben (PBS) oldott 10 µg/ml koncentrációjú poly-L-lysin (260.000 mólsúly) (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) helyeztünk a poliszitirén lemez vajúlataiba (Nunc Immunoplate, Intermed, Dánia), szobahőmérsékleten, egy éjszakán keresztül inkubáltunk.

Az LPS lemezhez kötése: 100 µl különböző koncentrációjú LPS oldatot adtunk a poly-L-lysinrel előérzékenyített lemezhez, amit ezután 1 órán át 37°C-on inkubáltunk. A lemezt 4x mostuk 0,05% Tween 20-t tartalmazó PBS-el (T-PBS). A rendszer beállítása után a lemez érzékenyítésére 1 µg LPS-t használtunk.

Nem specifikus kötőhelyek blokkolása: BSA-t, kazeint, kecske, juh, sertés, bovin, tengeri malac, ló savókat használtunk blokkoláshoz (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA).

200 µl különböző hígítású 0,5% kazeint, BSA-t, vagy a különböző savókat 30 percig 37°C-on inkubáltuk a lemezen, amit négyszeri (T-PBS) mosás követett. A módszer beállítása után a nem specifikus helyek blokkolására már csak 1:20 hígítású kecskesavót alkalmaztunk.

Immunsavó: 100 µl korábban kipróbált optimális hígítású savót adtunk minden lyukba, a lemezeket 1 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk, majd 4x mostuk T-PBS-el.

Konjugátum: 100 µl, 1:500 hígítású peroxidázzal konjugált anti-nyúl IgG-t (kecske savó) (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) adtunk minden lyukba. 1 óra 37 °C fokos inkubálás után a lemezeket 4x mostuk T-PBS-el.

Szubsztrát: minden lyukba 100 µl 0,01% o-fenilén diamin (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) peroxidáz szubsztrátot, és 0,03% H₂O₂ keverékét adtunk. A reakciót 10 perccel később 4N kénsavval leállítottuk. Az optikai denzitást 492 nm-n mértük le Titertek Uniscan fotométerrel (Flow Laboratories, Helsinki, Finland)

Minőség ellenőrzés és értékelés: A fotométert levegőre nulláztuk. A puffer optikai denzitása (OD) 0,000-0,100 közötti értéket kellett, hogy adjon. Ezután a fotométert a negatív kontrollra nulláztuk és olvastuk le az eredményeket. A pozitív és negatív (IgG mentes) kontroll közti különbség nagyobb volt, mint 0,800.

A humán szérumok vizsgálata esetében a detektáláshoz peroxidázzal konjugált anti-human immunglobulin keverékét (IgG, IgM és IgA), valamint IgM (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) készítményt alkalmaztunk. Egyebekben a módszer megegyezett a korábban ismertettekkel. Pozitívnak akkor értékeltük a kapott eredményeket, ha azok meghaladták a 0,3 optikai denzitást. Ez az érték a negatív kontrollok háromszoros standard deviációjának felel meg. Titeremelkedés kritériuma a negatív kontroll legalább kétszeres standard deviációjának megfelelő optikai denzitás növekedés volt.

3.7. Dot blot:

A Magyar és munkatársai által leírt, később általunk módosított eljárást alkalmaztuk. A reakciót 4-kloronaftol-peroxidáz szubsztrát hozzáadásával tettük láthatóvá.

3.8. Vékonyréteg kromatográfia (TLC):

A minták futtatása felszálló irányban Shandon-féle kromatográfias edényben történt. A monoszacharidokat Cellulose DC Plastikfolia (E. Merk, Darmstadt, Germany) vékonyrétegre (futtató közeg) csepegtettük és beszárítás után a következő eleggyel futtattuk (mozgó fázis): n-butanol-piridin-víz (6:4:3), valamint piridin-etilacetát-víz-ecetsav (5:5:3:1). Standardként ribóz, mannóz, galaktóz, glukóz, heptóz és glukózamin keverékét használtuk. Az előhívás Trevelyan és munkatársai által kifejlesztett ezüstözési módszerrel történt.

3.9. Gázkromatográfia, tömegspektrometria (GC-MS):

A gázkromatogram készítéséhez a vizsgálandó anyagot először illékonyá kellett tenni. Az acetilált cukrokat Agilent GC-MS gázkromatográfival (Agilent technologies, USA) 30 m, 251 µm átmérőjű Agilent DB-225 HP-1MS (Agilent technologies, USA) kapilláris oszlopon analizáltuk. A vivőgáz 15 ml/perc sebességgel 21 psi nyomáson áramoltatott nagy tisztaságú hélium volt. Az injector hőmérséklete 220°C, az oszlopé 180°C, a lángionizációs detektoré (FID) szintén 220°C. Belső standardként mesoinozitolt használtunk.

3.10. Oszlopkromatográfia:

Az LPS Lipid-A és poliszacharid részre való bontásához enyhe savas hidrolysist alkalmaztunk 1%-os ecetsav segítségével (100°C, 90 min). A felülúszót, amely a DPS-t tartalmazta további tisztításnak vetettük alá 2,5x80 cm hosszú Sephadex G-50 (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) oszlopon. A szétválasztáshoz pyridin-ecetsav puffert használtunk. Az 5 ml frakciók cukortartalmát koncentrált kénsav és fenol segítségével határoztuk meg.

3.11. Nukleáris mag rezonancia (NMR):

A ¹³C-NMR spektrumot Varian ^{UNITY}INOVA 400 WB (100 MHz for ¹³C) spectrometer segítségével készítettük. A méréseket 303K hőmérsékleten és 8 mg/ml D₂O oldatban végeztük. Belső standardnak acetont használtunk (δ_C = 31.07 ppm). A mérések alatt 46000 indukciós bomló jelt gyűjtöttünk (FID). A méréseket 64000 adalék pontértékekkel, 30° (2.5µ

s) pulzussal és 3s relaxációs idővel futtattuk. A Fourier transformáció előtt 3 Hz soros bővítést alkalmazva a FID jeleket exponenciálisan megsokszoroztuk.

3.12. Kapilláris elektroforézis (CE):

Mintáinkat a CE-SDS kit futtató pufferét használva a Biofocus 3000 (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) kapilláris elektroforetizáló rendszeren futtattuk. A molekulásúly meghatározására a Pharmacia molekulásúly kalibrációs standard görbéit, belső standardnak benzooesavat használtunk.

3.13. Lab-on-a-Chip (microchip) technológia:

A chip alapú elválasztást a kereskedelmi forgalomban is kapható Agilent 2100 Bioanalyzer system segítségével végeztük. A vizsgálatokhoz Protein 200 Plus LabChip Kits chipet használtunk. A chippek előkészítése és kezelése a Protein 200 LabChip Kit használati utasításnak megfelelően történt. Detektálásra laser indukált fluoreszcencia (LIF) szolgált.

3.14. Növekedésgátlási vizsgálat:

A vizsgált savók felező hígításait 1 ml táptalajt tartalmazó Widal csövekben állítottuk elő. Minden tesztsőbe 10 µl standardizált komplementet (Institute Virion Ltd., Switzerland) és 5 µl baktérium ($A_{600} = 0.6$) (UV-VIS photometer Perkin-Elmer, Germany) szuszpenziót adtunk. A táptalajok abszorpcióját 24 óra után 37°C-on történő inkubálás után olvastuk le.

3.15. Opcionizált baktériumok makrofág inváziója:

A log fázisban lévő baktérium tenyészetből ($A_{600} = 0,5$) 10 µl-t adtunk a monolayer RAW264.7 makrofág tenyészetbe. Az opsonizációhoz a baktérium tenyészetet előzőleg inaktivált specifikus immunsavó vagy a keresztreakciót adó immunsavók 1:1000 hígításával kevertük. Negatív kontrollnak inaktivált normál savót használtunk. Az extracellulárisan maradt baktériumokat 80 µg/ml gentamicin oldattal elöltük. A makrofágok által bekebelezett baktériumokat 1% Triton X-100-al (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) történt sejtlízis után szilárd táptalajon szélesztettük és a telepszámokat összehasonlítottuk a negatív kontrollként használt, opsonizáció nélküli vizsgálatok eredményeivel.

3.16. Genetikai vizsgálatok:

A primereket a *P. morgani* O34 (8662/64) megfelelő génjének szintetizálásához a vizsgált törzsek *manB* (foszfomannomutáz) szekvenciáit használva választottuk ki. A szekvencia analízis körülményei megfeleltek a korábban Wang és munkatársai által leírtaknak.

3.17. Statisztikai analízis elkészítéséhez az Origin 7.5 grafikai és statisztikai programot használtuk (OriginLab Corporation, Northampton MO, USA).

4. EREDMÉNYEK

4.1. Metodikai fejlesztés az LPS ELISA módszer érzékenységének növelésére

Endotoxikus hatású LPS optimális koncentrációjának beállítása: Az ELISA beállításához első lépésben a lemezt különböző koncentrációjú *S. sonnei* I. fázisú endotoxinnal érzékenyítettük. A 0,1 µg/ml koncentráció feletti LPS-eknél született jó eredmény, ezért az érzékenyítéshez a továbbiakban az optimálisnak bizonyult 1 µg/ml koncentrációt használtuk

Blokkolás beállítása: Második lépésben a szabad kötőhelyeket 0,5% BSA, 0,5% kazein és állatsavók hígításaival telítettük. A legkisebb OD-t a különböző állati eredetű savók 1:20 hígításánál, valamint a BSA és a kazein esetében, 1:100 hígításánál észleltük. A további beállításokhoz, az optimális blokkoló hígításokat használtuk.

A blokkoló anyagok összehasonlítása: Célunk elérésére BSA, kazein, kecske, juh, sertés, marha, tengerimalac, ló savókat teszteltünk és hasonlítottunk össze. Negatív kontroll esetén a kecskesavóval történt blokkoláskor kaptuk a legkisebb OD-t ($p < 0,001$), a különbség a kecskesavó és a kazein vagy BSA között szignifikánsnak bizonyult. Pozitív kontroll esetében a legjobb eredményt szintén a kecskesavó szolgáltatta, a különbség itt is szignifikáns

volt ($p < 0,001$). Az egyes állatsavók hatásai között nem észleltünk szignifikáns különbséget. Ezzel szemben a hagyományosan használt kazein és BSA a vizsgálatok során egyaránt elégtelennek bizonyultak.

A megbízhatóság vizsgálata: A megbízhatóság és ismételhetőség bizonyítására 12 különböző kísérletben 6-6 párhuzamos meghatározást végeztünk. Az intra-assay változások elhanyagolható mértékűek voltak (a pozitív kontroll szórása $SD=0,033$, míg a negatív kontroll szórása $SD=0,023$). Ugyanakkor az inter-assay szórások sem mutattak lényeges különbséget (pozitív kontroll szórása $SD=0,088$, míg a negatív kontrollé $SD=0,097$). Mindkét esetben a korábban már ismert szignifikáns különbségek változatlanul detektálhatók voltak. Az egyéni variációból adódó esetleges különbségek vizsgálata céljából 20 különböző egyedből származó savót is összehasonlítottunk. Az egyes mérések közt nem találtunk szignifikáns eltérést, a szórás is a korábban regisztrált tartományban maradt (pozitív kontroll esetén $SD=0,080$, a negatív kontrollé $SD=0,044$).

Kompetitív blokkolás: Először BSA, kazein vagy savós blokkolást végeztünk. A következő lépésben a savóval blokkolt helyeket BSA-val, illetve kazeinnel, valamint a BSA-val, kazeinnel blokkolt helyeket kecskesavóval újra kezeltük. Ha kecskesavót használtunk kiegészítő blokkolásnak, akkor megint szignifikánsan jobb ($p < 0,05$) eredményeket kaptunk, mint ha csak BSA-val vagy kazeinnel kezeltük volna a lemezeket. Ezzel szemben, ha BSA-val vagy kazeinnel kezeltük a korábban kecskesavóval blokkolt lemezeket, akkor azok szignifikánsan rosszabb ($p < 0,05$) eredményeket adtak, mintha csak savót használtunk volna.

Ez azt bizonyítja, hogy a kecskesavó jobban lefedi a szabadon maradt kötőhelyeket, de ugyanakkor kevésbé is kötődik az LPS-hez mint a hagyományosan használt blokkoló anyagok.

Endotoxinok összehasonlítása: Az új módszer használhatóságának tesztelése céljából különböző S, R és abszolút R baktériumok lipopoliszacharidjait vizsgáltuk. Vizsgálatainkhoz *S. sonnei* I., II. fázis és Re 4350, *E. coli* O21, O111, *S. Urbana* O30, *S. Adelaide* O35, *Y. enterocolitica* O9, *P. morgani* O1, O9, O43 LPS kivonatait használtuk. A kapott eredményeket összehasonlítva minden LPS típusnál a kecskesavó bizonyult a legjobb blokkolószernak.

Keresztreakció vizsgálata: Rendszerünk ilyen irányú vizsgálatára jól ismert szerkezetű és egymástól az egyes mutációk következtében csak kismértékben eltérő lipopoliszacharidokat használtunk. Kísérleteinkben a *S. sonnei* I. fázis ellenes savó keresztreakál a II. fázissal, de nem az abszolút R törzsszel, amit az O szerológiai tulajdonságért felelős cukrok hiányával magyarázunk. A másik két törzs ellen termelt savó reakciót ad mindhárom törzs LPS kivonatával. Vizsgálatainkkal ugyanakkor azt is tanulmányoztuk, hogy a használt blokkoló anyag mennyiben befolyásolja az ELISA érzékenységét. Kecskesavó használata esetén szignifikánsan magasabb optikai denzitást regisztrálhattunk, de mindhárom blokkoló anyag esetén az egyes lipopoliszacharidok jól elkülöníthetőek voltak.

4.2. Az optimalizált LPS-ELISA módszer klinikai használhatóságának kipróbálása

A klinikai használhatóság próbájához appendicitis miatt műtéten átesett betegek savóit használtuk ELISA rendszerünk tesztelésére. Az első szérummintát a műtét napján, a másodikat 14 nappal később vettük. Az optimalizált rendszerünkkel a gyulladás súlyosságával párhuzamosan emelkedő ellenanyag titeret mértünk és egyértelmű szoros összefüggést találtunk a szerológiai viselkedés és a szövettani kép között. A negatív kontroll és appendicitisben szenvedő betegek savói között a különbség szignifikáns volt (*E. coli* $p < 0,001$, *B. fragilis* $p < 0,005$).

Bacteroides fragilis LPS használatával emelkedő IgM szintet lehetett észlelni a legtöbb simplex és phlegmonosus appendicitisben szenvedő betegnél. Az IgG szint viszont lineáris emelkedést mutatott. *E. coli* lipopoliszacharidok használata esetén az ellenanyag szintek (IgM és IgG egyaránt), a gyulladás súlyosságával párhuzamosan emelkedtek és szoros

korrelációt mutattak a fertőzés súlyosságával, valamint a betegség kezdetétől eltelt idővel. Az abszolút R *Shigella sonnei* Re 4350 LPS-sel, mintegy általános, közös LPS-sel szemben a pozitív reakció gyakoribb volt (24 esetből 16), mint az egyéb, immunológiailag fajlagosabb bakteriális struktúrák ellen.

4.3. A keresztreakcióban résztvevő antigének tisztított formában való kinyerése és azonosítása

A tisztított LPS-t egyrészt változatlan formában, másrészt a vizsgálatok további céljainak megfelelően részleges (oligoszacharid) vagy teljes (monoszacharid) hidrolízist követően oszlopkromatográfiás eljárással izoláltuk, illetve szétválogattuk.

A külső membrán fehérjék kivonása az Osborn és munkatársai által leírt protokoll szerint történt. A külső membránt tartalmazó frakció fehérje összetevőit jellemeztük.

4.4. A korábban leírt szerológiai keresztkapcsolatok megerősítése, pontosítása érzékenyebb módszerek használatával

4.4.1. Reakciók teljes baktériumokon:

Csőagglutinációval reprodukálni tudtuk a Rauss, Ralovich és Vörös által elért eredményeket. **Dot blot**tal a különböző homológ és heterológ savókat használva az egyes baktériumtörzsek közel azonos reakciót adtak.

4.4.2. Reakciók tisztított LPS-el:

Haemagglutináció: Az előző vizsgálatok teljes baktériumsejttel történtek. Az LPS pontosabb szerológiai megismerése céljából a továbbiakban tisztított LPS-sel érzékenyített vörösvértesteket alkalmaztunk. Érdekes megfigyelés volt az, hogy míg a *P. morganii* O34 (8662/64) elleni immunsavó 1:1024 hígításában is agglutinálta a *S. Adelaide* O35 LPS-el érzékenyített vvt-eket, fordított esetben ez nem volt megfigyelhető (*S. Adelaide* O35 elleni immunsavó csak 1:256 hígításban agglutinálta a *P. morganii* O34 (8662/64) LPS-el érzékenyített vvt-eket). Ezt a jelenséget teljes baktériumsejt esetén nem tapasztaltuk. Feltételeztük, hogy a jelenséget az eltérő mennyiségű aktív kötőhelyek okozzák, ezért meghatároztuk az egyes LPS-ek DPS arányát, amely 59% volt *P. morganii* O34 (8662/64), 89% *E. coli* O111 és 72% *S. Adelaide* O35 LPS esetén.

ELISA: A lemezek érzékenyítéséhez a vizsgált baktériumokból nyert LPS-t, DPS-t és Lipid-A-t használtunk. Vizsgáltuk az egyes törzsek ellen termelt nyers immunsavókat és ezzel párhuzamosan a különböző antigénekkal kimerített (hővel előlt - 100°C, 60 min. - teljes baktérium) savókat is. A kis antigénszerkezeti különbségek jobb detektálása céljából a vizsgált immunsavókból hígítási sorozatot is készítettünk. Az *E. coli* O111 és *S. Adelaide* O35 esetén a reakciók intenzitása hasonló volt, azonban a *P. morganii* esetén az alacsonyabb DPS tartalomnak megfelelően kisebb értéket mutatott.

4.5. A hőstabil (LPS) antigén, cukorszerkezetének feltárása és összehasonlítása

Első lépésben a vizsgált baktériumsejt külső membránjából tisztított formában kinyert lipopoliszacharid **SDS-PAGE** gélelektroforézisét végeztük el. A vizsgált törzsek LPS PAGE mintázata ezüstözés után az egyes csíkok elhelyezkedését, egymáshoz való viszonyát tekintve hasonlóan mutatkozott, a három vizsgált LPS PAGE profilja egymásra helyezhető.

A szerológiai és szerkezeti hasonlóságot később **immunoblot** segítségével bizonyítottuk. Az LPS-ek nitrocellulóz membránra történt átvitele után mindhárom extraktumot külön-külön *P. morganii* O34 (8662/64), *E. coli* O111 vagy *S. Adelaide* O35 ellen termelt immunsavókkal kezeltük. Ezt követően a vizsgálatokat a kimerített immunsavókkal is elvégeztük. Az így kapott eredmények, bármelyik immunsavót használva további

bizonyítékkal támasztották alá azt az elképzelést, miszerint a szerológiai keresztreakciókban az O antigén játszik szerepet.

A **vékonyréteg kromatográfia** során a neutrális cukrok esetében két foltot találtunk, amelyek a standardként használt galaktóz és glukóz vonalában mutatkoztak és a retenciós idő is megfelelt a két neutrális cukor retenciós idejének. A colitóz (3,6 dideoxy-L-galactose), amely biztos összetevője az *E. coli* O111 O antigénnek, megfelelő mennyiségű autentikus colitóz hiányában nem volt meghatározható, de a glukóznak megfelelő foltok sokkal nagyobbak voltak, nagyobb mennyiségű anyagot mutattak, mint azt mólószámuk miatt vártuk. Feltehető, hogy a colitóz a glukózzal fut együtt. Ezt a colitóz szerkezetével tudjuk magyarázni, ugyanis az a galaktóztól abban különbözik, hogy a 3 és 6 pozícióban hiányzik a hidroxil gyök. Ez eredményezi azt, hogy a kromatográfiás eljárás során a galaktóznál gyorsabban, de a glukózzal egyszerre vándorol, és így az utóbbival egymásra vetülnek. Ha meghatározzuk a glukóznak és galaktóznak megfelelő foltok területét és intenzitását visszakapjuk a glukóz (colitózzal együtt) és galaktóz 3:1 arányát, vagyis az ismétlődő egységekben ismert cukorarányt. Mivel a colitózt direkt módon nem sikerült azonosítanunk, további vizsgálatokra volt szükségünk.

A **gázkromatográfiás és tömegspektrográfiás** vizsgálataink megerősítették korábbi elképzeléseinket, mivel mindhárom törzs LPS-ének vizsgálata hasonló spektrumot mutatott és mindhárom DPS esetén hasonló cukormolekulák, köztük a colitóz, voltak kimutathatók. Colitóz meghatározására prof. Stefan Oscarson-tól (Stocholm University, Inst. Org. Chem, Sweden) ajándékba kapott és általa szintetizált colitóz standardot használtuk.

¹³C-NMR spectrum felvétele után mindhárom DPS-ben kimutatható volt a colitóz jelenléte és a vizsgált poliszacharidok spektruma is hasonló eredményeket mutatott. Eltekintve néhány egyértelműen szennyeződésből adódó, a vizsgált cukrokkal össze nem függő csúcstól, a három spektrum superponálható volt, vagyis a *P. morganii* O34 (8662/64), *E. coli* O111, *S. Adelaide* O35 O antigén szerkezete hasonlóan bizonyult.

4.6. Genetikai hasonlóság detektálása a három vizsgált törzs *rfb* gén clusterében

Próba vizsgálatként a *P. morganii* O34 O antigén gén cluster **colitóz szintéziséért felelős génjei egyikének**, nevezetesen a *manB* génnek a bázisszekvenciáját határoztuk meg. A primerek összeállításában a korábban ismert *E. coli* O111 megfelelő génjét használtuk mintaként. A szintetizált génszakasz szekvenciasorrendjét a génbankba helyeztük EF051576 szám alatt. Az így nyert DNS szintetizátum és szekvencia vizsgálata 70%-os megegyezést mutatott a *P. morganii* O34 (8662/64) és *S. Adelaide* O35, valamint 69%-os megegyezést mutatott a *P. morganii* O34 (8662/64) és *E. coli* O111 DNS szekvenciái között. Ezzel szemben az *E. coli* O111 és *S. Adelaide* O35 DNS korábban tárgyalt génszakasza 84,4%-os homológiát mutat.

4.7. A közös hőlabilis (fehérje) antigén identifikálása

A **külső membrán fehérjék kapilláris elektroforézises profilja**: Mindhárom kapilláris elektroforetikus OMP profilt a 35-50 kDa. közötti csúcsok dominálták, amelyek jól korreláltak a később elvégzett mikrochip alapú elektroferogramokkal. A *P. morganii* O34 (8662/64) két jellegzetes csúcsot (36, 41 kDa) adott. Az *E. coli* O111 esetében több csúcs mellett, a 36, 40, 45 kDa. fehérjék domináló jellege, míg a *S. Adelaide* O35 esetén a közös domináló és a 39 kDa nagyságú fehérje is kimutatható.

Az **OMP chip alapú elektroforezise**: A *P. morganii* O34 (8662/64) membránprofilja két major külső membrán fehérjét tartalmaz a 36 és 41 kDa molekulásúly tartományban. Ugyanebben a régióban az *E. coli* O111 membránprofilja három különböző fehérjét mutat a 36, 41 és 45 kDa-nak megfelelően, azonban a 36 kDa fehérje mennyisége sokkal nagyobb a másik kettőhöz viszonyítva. A *S. Adelaide* O35 külsőmembrán fehérje képét a 39 kDa

nagyságú fehérje dominálja. Ezt a fehérjét azonban a másik két baktérium esetében nem lehetett kimutatni. Emellett a 36, 41 és 45 kDa fehérjék is jelen vannak.

A közös fehérjék (36, 41 kDa) jelenlétét megerősíti az egyidőben történt injektálás is, amely során a korábban említett fehérjék mennyisége a szuperponálás miatt a háttérhez képest megnőtt, az egyes fehérjék jobban elkülönültek. A *P. morganii* O34 (8662/64) és *E. coli* O111 közös képen a 36, 41 kDa molsúlyú fehérjék mellett az *E. coli*-ban észlelt 45 kDa fehérje is kimutatható. *P. morganii* O34 (8662/64) és *S. Adelaide* O35 koinjekció esetében a 36 és 41 kDa molsúlyú fehérjék mellett láthatóvá vált a 39 kDa molsúlyú *S. Adelaide*-ben észlelt fehérje is. A három baktérium külső membrán fehérjeinek koinjekciója esetén azonban csak a 36 és 41 kDa nagyságú fehérjék dominálnak.

SDS-PAGE és Western blot analízis: A kapilláris elektroforesis és a chip alapú elektroferogramok alapján közös fehérjék expresszióját feltételeztük. Ennek bizonyítása céljából a külső membrán fehérjék western blot vizsgálatát is elvégeztük. A gélben szétválasztott és blottolt fehérjéket mind a *P. morganii* O34 (8662/64), mind az *E. coli* O111 és *S. Adelaide* O35 36 és 41 kDa nagyságú fehérjei ellen termelt savóval kezeltük. Mindhárom esetben a vizsgált savók nemcsak a saját, hanem a vizsgálatban résztvevő másik két baktérium törzsből származó fehérjével is egyforma erősségű immunreakciót adott.

4.8. A keresztreagáló antigének kiváltják-e a keresztprotektivitást biztosító ellenanyagok termelését?

A bakteriális növekedés gátlása: A vizsgált immunsavó és komplement jelenlétében a gátlás szignifikánsan nagyobb volt még nagy savóhígításban is ($p < 0,001$), mint a kontrollok esetében. Ez azt jelenti, hogy a *P. morganii* O34 (8662/64) ellen termelődött savó képes a keresztreagáló törzsek növekedését gátolni. A negatív kontrollként alkalmazott *Serratia marcescens* esetében gátlást nem tapasztaltunk.

A keresztreagáló immunsavók opszonizációt és makrofág inváziót fokozó hatása: Opszonizációs vizsgálatainkban a makrofágok (RAW264.7) baktérium felvétele specifikus ellenanyag jelenlétében szignifikáns ($p < 0,001$) növekedést mutatott, hogyha azt a nonspecifikus savó vagy ellenanyag mentes környezetben történő baktérium felvételéhez hasonlítottuk. Vizsgálataink egyértelműen azt mutatják, hogy a *P. morganii* O34 (8662/64) ellen termelődött ellenanyagok alkalmasak lehetnek a másik két vizsgált törzs fagocitózisának fokozására.

4.9. A további kutatási lehetőségek feltárása

Csőagglutináció, haemagglutináció, dot blot, ELISA és növekedés gátlási vizsgálatok, valamint LPS-PAGE-n alapuló eddigi eredményeink azt mutatják, hogy a ***P. morganii* O43:12 (Louvain) - *Y. enterocolitica* O9 - *E. coli* O157:H7 - *S. Urbana* O30 - *Brucella abortus***, valamint a ***P. morganii* O9 (352/56) - *E. coli* O21;K20 - *S. Inverness* O38 - *Salmonella* O44 - *Citrobacter freundii* O14**, illetve a ***P. morganii* O29 (1594) - *E. coli* O112ac;K68 - *S. dysenteriae* 2** törzsek között szerológiai hasonlóság van. A későbbiekben ezen keresztreakciókban résztvevő antigének azonosítását és szerkezeti elemzését tervezzük.

5. MEGBESZÉLÉS ÉS AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A Gram-negatív baktériumok között gyakran előforduló szerológiai keresztkapcsolatok vizsgálatára ma már számos olyan módszer áll rendelkezésünkre, amely az immunológiai jellegű technikákon túl genetikai, molekuláris biológiai, szerkezeti meghatározásokon keresztül próbálja feltárni ezen reakciók jellegét.

1-2. A leggyakrabban használt immunológiai módszerek egyike az **ELISA**. A rendelkezésünkre álló, kipróbált rendszerek érzékenysége nem felelt meg az elvárásoknak, mert a blokkolásra használt BSA aspecifikus kötődése az LPS-hez a reakció alkalmazhatóságát korlátozta. A probléma kiküszöbölése érdekében **módszertani fejlesztést végeztünk**. Az optimálisnak talált blokkoló anyag (kecskesavó) használatával **szignifikánsan jobb** eredményeket értünk el, a módszer alkalmassá vált kis mértékű antigénszerkezetbeli különbségek megbízható detektálására is. Módszerünket különböző rendszerekben, így a *S. sonnei* **mutánsok elkülönítésén** túl, **klinikai minták** vizsgálatával is teszteltük.

3. A korábban csak csőagglutinációs módszerrel megállapított *P. morganii* O34 (8662/64), *E. coli* O111 és *S. Adelaide* O35 közötti keresztkapcsolatokat újabb, érzékenyebb immunológiai módszerek széles skálájának felhasználásával **bizonyítottuk**, és **megerősítettük**.

4.-5. Az immunológiai reakciókban résztvevő hőstabil, **lipopoliszacharid antigéneket kipreparáltuk, tisztítottuk** és kémiai módszerek segítségével azok **szerkezetét is meghatároztuk**. Korábban három esetben bizonyították, hogy két rendszertanilag egymástól távol álló baktérium egyforma O antigént hordoz. Vizsgálataink után ezt a sort egy újabb taggal bővíthetjük, ugyanis eredményeink azt bizonyítják, hogy a *P. morganii* O34 (8662/64), *E. coli* O111 és *S. Adelaide* O35 lipopoliszacharidjainak ismétlődő egységei azonosak. Mindhárom baktérium tartalmaz egy, a természetben ritkán előforduló cukormolekulát, a 3,6-dideoxy-L-galaktózt, közismert nevén **colitózt**, amit mind **gázkromatográfiával** és **tömegspektrográfiával (GC-MS)**, mind **NMR** segítségével ki tudunk mutatni.

6. A vizsgált baktériumok genetikai rokonságának bizonyítására a *P. morganii* O34 (8662/64) colitóz szintéziséért felelős **gécsoport** egyik génjének (*manB*) **szekvenálását** is elvégeztük. A kérdéses gén nagyfokú hasonlóságot mutatott *E. coli* O111 és *S. Adelaide* O35 megfelelő génjével. A szintetizált génszakasz szekvencia sorrendjét a génbankba helyeztük, ott EF051576 szám alatt érhető el.

7. Ismert, hogy a hasonló LPS-t hordozó baktériumok külső membrán fehérjéi is hasonlóak. Ezért megvizsgáltuk, mely fehérjék játszanak szerepet a keresztreakció kialakításában. Egy **36 és egy 41 kDa** nagyságú fehérje mindhárom törzsben kimutatható volt, és immunblot reakció alapján szerológiailag is hasonlóknak bizonyultak.

8. Hasonló vagy azonos antigének hordozása esetén jogosan merül fel a kérdés, vajon ezek a közös antigének (fehérje vagy lipopoliszacharid molekulák) alkalmasak lehetnek-e keresztimmunitás kiváltására. Ennek bizonyítására elvégzett **növekedés gátlási** és **opszonizációs** vizsgálatok megerősítették, hogy az egyik törzs ellen termelődött ellenanyagok komplement jelenlétében növekedést gátló hatásúak a keresztreakáló törzsekkel szemben, emellett opszonizáló hatásukkal önmagukban is elősegítik azok makrofágok általi bekebelezését.

9. A bevezetett és eredményesen használt immunkémiai módszerek **további lehetőségeket biztosítanak** a Gram-negatív baktériumok közötti szerológiai keresztkapcsolatok jövőbeni, szélesebbkörű vizsgálatára.

A témával közvetlenül kapcsolatos közlemények és előadások jegyzéke

Közlemények:

1. **Péterfi Z**, Kocsis B: Comparison of blocking agents for an ELISA for LPS, J. Immunoassay 2000, 21(4): 341-354 **IF: 1,286**
2. **Péterfi Z**, Kocsis B: Hogyan válasszunk blokkoló anyagot az endotoxin-ELISA érzékenységének növeléséhez? Orvostudományi Értesítő 2000, 73:166-171
3. **Péterfi Z**, Kustos I, Kocsis B: Szerológiai keresztkapcsolatok vizsgálata a *Proteus morganii* - *Escherichia coli* – *Salmonella* Adelaide törzsek között. Orvostudományi Értesítő 2003/2; 76: 142-150
4. **Péterfi Z**, Kovács K, Antal A, Kocsis B: Anti-LPS antibodies in acute appendicitis detected by ELISA. APMIS 2006; 114(4):265-9. **IF: 2,127**
5. **Péterfi Z**, Kustos I, Kilar F, Kocsis B: Microfluid chip analysis of outer membrane proteins responsible for serological cross reaction between three Gram-negative bacteria: *Proteus morganii* O34, *Escherichia coli* O111 and *Salmonella* Adelaide O35 J. Chromatography A, közlésre elfogadva **IF: 3,096**
6. **Péterfi Z**, Ósz E, Reuter G, Kilar F, Kocsis B: Structural and serologic properties of O-specific polysaccharide from *Proteus morganii* O34 (8662/64) possessing cross-reactivity with *Escherichia coli* O111 and *Salmonella* Adelaide O35. J Chromatography B, bírálat alatt (elfogadás esetén várható **IF: 2,391**)

Egyéb kiemelt közlemények:

1. Nemes Zs, Kiss G, Madarassi PE, **Péterfi Z**, Ferenczi E., Bakonyi T, Ternák G: Nosocomial transmission of Dengue. Emerging Infect Dis. 2004; 10(10):1880-1 **IF: 5,643**
2. Nemes Zs, **Péterfi Z**: A *Campylobacter jejuni* enteritis, mint a dysenteria syndroma képviselője, Medicus Universalis XXXI/1, 1998, 13-15
3. Nemes Zs, **Péterfi Z**: Kullancs által közvetített újabb betegség - a humán ehrlichiózis, Praxis 1998; 7(11):56-58
4. Nemes Zs, **Péterfi Z**: Együttes leptospira- és hantavírus-fertőzés ugyanabban a betegben, Orv. Hetil 2000, 141 (10): 499-502
5. **Péterfi Z**, Nemes Zs: Leptospirosis és hantavírus fertőzés. Orvostudományi Értesítő 2000, 73:172-175
6. **Péterfi Z**: Emerging fertőző betegségek Orvostudományi Értesítő 2004/1; 77(1):52-62
7. **Péterfi Z**: Legionellosis és más atípusos pneumoniák, Magyar Orvos 2006; 15(5):18-25
- ...

Absztraktok:

1. **Péterfi Z**, Mazák I, Kocsis B, Vörös S: Immunochemical and serological analysis of *Proteus morganii* strains, Acta Microbiol. Hung. 1999. 46: 131
2. **Péterfi Z**, Kocsis B: Optimization of ELISA test used for detection of serological cross-reaction between lipopolysaccharides, Acta Microbiol. Hung. 2000. 47:215
3. Kocsis B, Kustos I, **Péterfi Z**: Isolation and characterization of a *Shigella sonnei* absolute rough mutant, Acta Microbiol. Hung. 2000. 47:217
4. **Péterfi Z**, Kovács K, Antal A, Kocsis B: Serological examinations in acute appendicitis Acta Microbiol. Hung. 2004. 51:156
5. **Péterfi Z**, Kustos I, Kocsis B: Serological cross reaction examination between *Proteus morganii* - *Escherichia coli* – *Salmonella* Adelaide Acta Microbiol. Hung. 2003. 50:231
6. Kilar F; Bui A; **Péterfi Z**; Kustos I; Kocsis B.: Bacterial Endotoxins. A complex study by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence, Rome, Italy, ITP, 2004. - L 25

Előadások és poszter bemutatások:

1. **Péterfi Z**, Mazák I, Kocsis B, Vörös S: A *Proteus morganii* törzsek immunkémiai és szerológiai vizsgálata. előadás, Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Miskolc, 1998. aug.
2. **Péterfi Z**, Kocsis B: Optimization of ELISA test used for detection of serological cross-reaction between lipopolysaccharides. poszter, 13th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. Budapest. 1999. aug. 30
3. Kocsis B, Kustos I, **Péterfi Z**: Isolation and characterization of a *Shigella sonnei* absolute rough mutant. előadás, 13th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. Budapest. 1999. aug. 30
4. **Péterfi Z**, Kocsis B: Hogyan válasszunk blokkoló anyagot az endotoxin-ELISA érzékenységének növeléséhez? előadás EME Orvostudományi és Gyógyszerészeti Szakosztály X. Tudományos Ülésszaka, Székelyudvarhely, Románia 2000. Május 11-13

5. **Péterfi Z**, Nemes Zs: Leptospirosis és hantavírus fertőzés. előadás EME Orvostudományi és Gyógyszerészeti Szakosztály X. Tudományos Ülésszaka, Székelyudvarhely, Románia 2000. Május 11-13.
6. Nemes Zs, **Péterfi Z**, Ferenczi E: Zoonózisok együttes előfordulása betegeinkben poszter Magyar Infektológiai Társaság éves kongresszusa, Budapest 2000. Okt. 12-14
7. **Péterfi Z**, Kustos I, Kocsis B: Szerológiai keresztkapcsolatok vizsgálata a *Proteus morganii* - *Escherichia coli* – *Salmonella* Adelaide törzsek között, poszter Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Balatonfüred, 2001
8. **Péterfi Z**, Kovács K, Antal A, Kocsis B: Acut appendicitis szerológiai vizsgálata előadás Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Balatonfüred, 2002
9. **Péterfi Z**, Kustos I, Kocsis B: Szerológiai keresztkapcsolatok vizsgálata a *Proteus morganii* - *Escherichia coli* – *Salmonella* Adelaide törzsek között, előadás EME Orvostudományi és Gyógyszerészeti Szakosztály XIII. Tudományos Ülésszaka, Sepsiszentgyörgy, Románia, 2003. Május 29-31
10. Bui A, **Péterfi Z**, Kustos I, Kocsis B, Kilar F: Analyzation of 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid-labelled hydrolyzed endotoxins by capillary electrophoresis, poszter 5th International symposium and course, Teaching and learning of „analytical and bioanalytical monitoring methods” 2004 31 May-07 June Sofia, Bulgaria
11. Bui A, **Péterfi Z**, Kustos I, Kocsis B, Kilar F: Optimization of experimental conditions in the analysis of 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid-labelled hydrolyzed endotoxins by capillary electrophoresis poszter 14th International Symposium on Capillary Electro separation Techniques, Rome, Italy, September 12-15, 2004
12. Kilar F, Bui A, **Péterfi Z**, Kustos I, Kocsis B: Bacterial endotoxins. A complex study by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence előadás 14th International Symposium on Capillary Electro separation Techniques, Rome, Italy, September 12-15, 2004

Összesített publikációk jegyzéke

Könyvfejezetek száma (Betegség enciklopédia, Springer kiadó, 2002):	19
Cikkek összesített száma:	25
Előadások és poszterek száma:	42
Összesített impakt faktor:	13,016 (+2,391 bírálat alatt)
Független idézések száma:	20