

A Magyar Mikrobiológiai Társaság

2004. évi Nagygyűlése

és a

X. Fermentációs Kollokvium

ELŐADÁS KIVONATOK

Rendezők:

Magyar Mikrobiológiai Társaság és az MMT Alapítványa,
MTA Biomérnöki Munkabizottsága,
Magyar Biokémiai Egyesület Biotechnológiai Szakosztálya

Hotel Helikon, Keszthely

2004. október 7-9.

ÁDÁM ATTILA L.¹, OLÁH BRIGITTA^{1,2}, KERÉNYI ZOLTÁN², KESZTHELYI ANITA^{1,2}, HORNOK LÁSZLÓ^{1,2}

Jelátviteli útvonalak a *Gibberella fujikuroi*-ban

¹SZIE Mezőgazdasági Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék; ²MTA Mikológiai Kutatócsoport, Gödöllő

A fonalas gombák mitogén aktivált protein kináz (MAPK) génjeit az I, a VIB és a VII kinázdomén alcsoport specifikus konszenzus szekvenciái alapján három nagy csoportba sorolhatjuk: a YerK1 (yeast extracellularly regulated kinases), a YerK2 és az OsrK (osmoregulatory kinases) csoportba. A MAPK fehérjék funkcionális változatossága még ennél is nagyobb. Fehérje gélelektroforézis segítségével azonosítottunk a *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium proliferatum* MP-D) gomba micélium-kivonatában egy 49 kDa molekulatömegű MBP (mielin bázikus protein) kinázt, amely feltehetően a *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 illetve a humán MAPK^{jnk} proteinek funkcionális homológja. Ezt a kináz aktivitást mind a hőstressz (45C^o), mind az ozmotikus sokk (1,0 M szorbit), mind pedig az oxidatív stressz (H₂O₂) kiváltotta a kezelt micéliumban, jelezve, hogy a fehérje többféle stresszválasz közvetítésében vesz részt. Amikor az ozmotikus stresszt 4% NaCl hozzáadásával váltottuk ki, az említetten kívül még egy másik MBP kináz is aktiválódott, amelynek molekulatömege a protein kináz A (PKA) molekulatömegéhez (40 kDa) volt hasonló. A konídiumcsírázás korai szakaszában további két kináz aktivitást (62 és 70 kDa) észleltünk. A többszörös kináz aktivitások jelenléte a csírázó konídiumban a morfogenetikus és stresszadaptációs folyamatok komplex foszforilációs szabályozását sejteti.

A MAPK és cAMP-PKA szignálviteli útvonalak stressz alatt megnyilvánuló kölcsönhatásának vizsgálatára klónoztuk az adenilát cikláz gént (*gac1*) a gombából a genomi könyvtár specifikus PCR-fragmentummal történő szűrésével. A gén inaktiválására irányuló kísérletekben egy sor olyan transzformánst kaptunk, amelyek optimális tenyésztési körülmények mellett is torz növekedést mutattak, ami arra enged következtetni, hogy a *gac1* alapvető szerepet játszik a táplálkozási viszonyokban bekövetkező változásokhoz történő alkalmazkodásban.

A kutatást az OTKA T43221 és T46529 pályázatok támogatták.

ÁGOSTON RÉKA¹, BECZNER JUDIT², CSERHALMI ZSUZSANNA²

Egyedi és kombinált kezelések hatása *Alicyclobacillus acidoterrestris* spórákra és vegetatív sejtekre

¹BCE Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék; ²Központi Élelmiszer-tudományi Kutató Intézet, Budapest

Az élelmiszeriparban az egyik legnagyobb gondot a spórás baktériumok jelentik, mivel a spórák nagyságrendekkel ellenállóbbak a tartósítási eljárásokkal szemben, mint a vegetatív sejtek. A mikrobiológiailag hatékony kezelések azonban gyakran kedvezőtlenül befolyásolják az élelmiszerek élvezeti minőségét. A kombinált kezelési lehetőségek hatékonyak lehetnek a spórákkal szemben, valamint kielégíthetik az élelmiszerbiztonság és minőség kettős követelményét.

Az *Alicyclobacillus acidoterrestris* egy fontos, gyümölcslevek romlását okozó hő- és savtűrő spórás baktérium. A pulzáló elektromos térerő (PEF), besugárzás és nizin egyedi és kombinált hatását vizsgáltam két különböző szaporodási tulajdonságú *Alicyclobacillus acidoterrestris* törzsön. A kombinált kezelésekre vonatkozóan szinergenciaszámításokat végeztem. A besugárzás és a PEF önmagában hatékonyan csökkentette a vegetatív sejtek számát. A spórák ellenállóbbak voltak mindkét kezeléssel szemben. A hatás erősen törzsfüggő volt, a gyorsan szaporodó törzs érzékenyebb volt a kezelésekkal szemben, mint a lassan szaporodó. A besugárzás és a PEF kezelés kombinációja minden esetben additív volt. A nizin mind a spórák, mind a vegetatív sejtek esetében már igen alacsony koncentrációban gátolta a baktérium növekedését.

ANTAL ZSUZSANNA¹, HOPP BÉLA², SMAUSZ TAMÁS², KRESZ NORBERT³, BOR ZSOLT³, CHRISEY DOUGLAS⁴

Egy *Trichoderma* törzs konidiumainak irányított, lézeres, térbeli mozgatása

¹MTA-SZTE Mikrobiológiai Kutatócsoport; ²MTA-SZTE Lézerfizikai Tanszéki Kutatócsoport; ³SZTE Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék, Szeged; ⁴Naval Research Laboratory, Washington, USA

A lézeres eljárásokat, szokásos módszereket felülmúló lehetőségeiknek köszönhetően, egyre gyakrabban alkalmazzák biológiai anyagok és szervezetek leválasztására és szabályozott átvitelére is. Háromdimenziós biológiai struktúrák építéséhez, a fejlett szövetmérnökséghez, újgenerációs szövetalapú érzékelő eszközök kialakításához vagy mikroorganizmusokkal történő „építkezéshez” technikai oldalról szükséges az összetett rendszerek és rétegek élő sejtekből és biológiai anyagokból történő felépítésének kidolgozása. A lézertény által kiváltott előre irányuló átvitel (LIFT) egy közvetlen írási módszer, melynek során egy egyedi lézer impulzus szolgál egy fényelnyelő vékonyréteg, átlátszó hordozóról való eltávolítására, és egy párhuzamosan elhelyezett befogadó felületre történő átvitelére. Feltételezésünk szerint ezzel a módszerrel lehetséges a biológiai anyagok kíméletes, kémiai-biológiai szerkezetük, sőt életképességük megőrzésével történő átvitele. Az alábbiakban egy elnyelő réteg által elősegített, lézertényel kiváltott előre irányuló átvitelről (AFA-LIFT) számolunk be, ahol a cél élő *Trichoderma* konídiumok szabályozott térbeli áthelyezése volt egy hordozó lemezre.

A *Trichoderma* nemzetség tagjai elterjedt talajlakó fonalagombák. Számptalan izolátum rendelkezik kiemelkedő extracelluláris lebontóenzim termelő képességgel, mely tulajdonság megfelel ökológiai szerepüknek, a növényi hulladékanyagok lebontásában való részvételüknek. Extracelluláris enzimeikkel a *Trichoderma* törzsek képesek megtámadni és parazitálni más gombákat, megalapozva ezzel a mezőgazdaságban növénypatogén gombákkal szemben biokontroll szervezetként való alkalmazásukat.

Az AFA-LIFT módszer élő sejteken történő vizsgálatához egy *Trichoderma longibrachiatum* törzs konídiumait szélesítettük ezüst réteggel bevont, kvarc tárgylemez felületére. Az átvivő KrF excimer lézernyaláb a kvarc tárgylemez átlagosan 0,08 mm²-es területére volt fókuszálva. A fogadó oldalon egy táptalajjal bevont üveg tárgylemezt alkalmaztunk hordozóként. Az átvitelt követő inkubációs idő leteltével számos csírázó konídiumsziget jelent meg a táptalajon, a besugárzott célterületeknek megfelelő térbeli elhelyezkedésben. A kihajtott konídiumok által lefedett területet a lézernyaláb energiasűrűségével összevetve megállapítottuk, hogy a legnagyobb terület (0,25 mm²) a 355 mJ/cm² energiasűrűségű besugárzással érhető el, melyből számolva az AFA-LIFT-tel végzett sikeres átvitel és csírázás maximális határfoka 75 %-nak adódott. Kísérleteink bebizonyították, hogy az AFA-LIFT technológia megfelelő módszer *Trichoderma* konídiumok irányított térbeli mozgatására, mivel azok megőrizték életképességüket a folyamat alatt. Eredményeink alapján megállapítható, hogy az általunk kidolgozott módszer egy rendkívül ígéretes technika élő sejtek, szervezetek irányított átvitelére, s ennek eredményeképpen akár élő szövetek felépítésére is.

A kutatómunka az Országos Tudományos Kutatási Alap F037663, T34825 és TS 040759 számú pályázatainak támogatásával készült.

ANTAL ZSUZSANNA¹, KREDICS LÁSZLÓ¹, SZEKERES ANDRÁS², MANCZINGER LÁSZLÓ², HATVANI LÓRÁNT², NAGY ERZSÉBET^{1,3}

Klinikai mintákból izolált *Trichoderma* törzsek extrakromoszómális elemeinek vizsgálata

¹MTA-SZTE Mikrobiológiai Kutatócsoport; ²SZTE TTK Mikrobiológiai Tanszék; ³SZTE OEK Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet, Szeged

Extrakromoszómális genetikai elemek néven mindazon változatos nukleinsav molekulákat foglaljuk össze, melyek a magi DNS mellett még előfordulhatnak a sejtekben. E csoportba tartozik a mitokondriális DNS, mely minden eukarióta sejtben megtalálható. Restrikciós fragment hossz polimorfizmusának vizsgálata széles körben elterjed gombák összehasonlító tanulmányozásánál. Egyéb kettősszalú DNS vagy RNS (dsRNS) molekulák jelenléte nem minden sejtre jellemző, de a gombák világában meglehetősen gyakori. A dsRNS gombavírusok a citoplazmában helyezkednek el, s bár látens illetve kriptikus voltuknak megfelelően a fertőzött gombán tünetek többnyire nem figyelhetőek meg, néhány esetben jellegzetes fenotípus társul jelenlétükhöz, mint például a killer tulajdonság *Saccharomyces cerevisiae*-ben, vagy a csökkent mértékű virulencia *Cryphonectria parasitica*-ban.

A *Trichoderma* fajok fonalagombák, melyek gyakran megtalálhatóak művelésbe vont és természetes talajokban egyaránt. Egyes izolátumok tulajdonsága, miszerint képesek növénypatogén gombákat megtámadni, ígéretes biológiai kontroll jelöltékké teszik őket gombák okozta betegségekkel kapcsolatban. Bár a *Trichoderma* törzseket régebben veszélytelen mikroorganizmusként tartották számon, az utóbbi két évtizedben bizonyos törzsek természetes gombákon előidézett zöldpenész járvánnyal okoztak jelentős gazdasági veszteségeket. Mindezeket túl, a nemzetség néhány tagja újabban

opportunista gombafertőzéseknel bukkant fel, melyek előfordulása növekvő gyakoriságot mutat. Elsősorban *Trichoderma longibrachiatum* törzsekkel kapcsolatos egészségügyi problémákról találhatók híradások, melyekben a lokalizált fertőzésektől egészen a halálos kimenetelű, szétterjedt megbetegedésig terjedő hatásról tudósítanak.

Kísérleteink célja klinikai-, illetve talajmintákból származó *Trichoderma longibrachiatum* törzsek extrakromoszómális elemeinek vizsgálata, továbbá a fellelhető különbségek felderítése volt. Kilenc, klinikai mintából származó, valamint 8, talajból izolált törzsből állítottunk elő teljes DNS kivonatot, majd a nukelinsavakat *Bsu*RI illetve *Hin*6I restriktions enzimekkel emésztettük. A *Hin*6I-es emésztés után előállt mtDNS RFLP mintázatok különbözőségeinek alapján a klinikai törzsek 5, a talajizolátumok pedig négy mtDNS típusba sorolhatóak. Bár azonos méretű fragmentek megfigyelhetőek a klinikai- és a talajból származó törzsek mintáiban, teljesen egyező mintázatot nem találtunk. A *Bsu*RI enzimmel végzett kísérletek alapján a mtDNS típusokba való sorolás hasonlóan mutatkozott. Ezen eredmények alapján a *T. longibrachiatum* fajon belül nagyfokú polimorfizmus jellemzi az izolátumokat mtDNS szinten. Mivel egyes dsRNS vírusok hatást gyakorolnak a hordozó törzs fenotípusára illetve virulenciájára, e szempontból is vizsgálatnak vetettük alá a *T. longibrachiatum* törzseket. A dsRNS molekulák teljes nukleinsav mintából való, CF11 cellulóz kromatográfiával történő tisztítása és agaróz gélelektroforézissel való elválasztása az izolátumok dsRNS vírusoktól való mentességét jelezte. A kutatómunka az Országos Tudományos Kutatási Alap F037663 számú pályázatának támogatásával készült.

ANTAL ZSUZSANNA¹, SZEKERES ANDRÁS², KREDICS LÁSZLÓ¹, MANCZINGER LÁSZLÓ², HATVANI LÓRÁNT², NAGY ERZSÉBET^{1,3}

Kettősszálú RNS molekulák jelenlétének vizsgálata, szántóföldről izolált *Trichoderma* törzsekben

¹MTA-SZTE Mikrobiológiai Kutatócsoport; ²SZTE TTK Mikrobiológiai Tanszék; ³SZTE OEK Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet, Szeged

A kettősszálú RNS (dsRNS) gombavírusok olyan extrakromoszómális genetikai elemek, melyek számos élesztő és fonalgomba törzs citoplazmájában megtalálhatóak. Mivel e gombavírusok zömmel látensek vagy kriptikusak, a megfertőzött gombákon tünetek többnyire nem figyelhetőek meg, néhány esetben azonban jellegzetes fenotípus kötődik a jelenlétükhöz. Ilyen például a *Saccharomyces cerevisiae* killer tulajdonsága vagy a *Cryphonectria parasitica* esetében megfigyelhető csökkent mértékű virulencia. Bár ép sejtekre nézve nem fertőzőek, és egyedek közötti terjedésük is csak hifa anasztomózissal mehet végbe, néhány dsRNS vírust virulenciát csökkentő hatása miatt már használnak, illetve továbbiak biológiai kontroll elemként való alkalmazását is javasolják.

A *Trichoderma* fajok elterjedt fonalgombák, melyek nagy gyakorisággal találhatóak meg mind művelt mind természetes talajokban. Gombák által okozott növényi megbetegedésekkel szembeni harcban biológiai kontroll elemként való alkalmazhatóságuknak vizsgálata több mint 70 éves múltra tekint vissza, de használják őket növényvédőszeres és cellulóztartalmú anyagok lebontására is. Mindezek mellett azonban az utóbbi két évtizedben termesztett gombák Európában és Észak Amerikában is terjedő, zöld penész járványának kórokozójaként is *Trichoderma* törzseket azonosítottak. A támadó biotípus azonosítására, jellemzésére, valamint visszaszorítására kiterjedt kutatások folynak napjainkban. A *Trichoderma* nemzetségen belül eddig csak egyetlen híradás jelent meg dsRNS molekulák jelenlétéről. Ezek 2,7 kbp nagyságú plazmid molekulák voltak, melyek részletes vizsgálatára nem került sor. Az általunk vizsgált, magyarországi talajmintákból származó törzsek dsRNS tartalmának vizsgálatához a micéliumokból előállított teljes nukleinsav kivonatot CF11 cellulóz kromatográfiával tisztítottuk, és a nukleinsav molekulákat agaróz gélelektroforézissel elválasztottuk. A molekulák összetételét S1 nukleázzal, RN-ázzal illetve DN-ázzal történő emésztéssel vizsgáltuk. Összesen három, dsRNS hordozó törzset találtunk 105 *Trichoderma* izolátum között, melyek közül kettő egy-egy 7 kbp nagyságú dsRNS molekulát tartalmazott. A másik dsRNS elem méretben eltért az előbb említett molekuláktól, és körülbelül 10 kbp nagyságúnak mutatkozott. Mivel a tenyésztés hőmérséklete gyakran befolyásolja az extrakromoszómális genetikai elemek jelenlétét és stabilitását, a 7 kbp méretű dsRNS-sel fertőzött törzsek 25 illetve 34 C fokon nevelt mintáiból is állítottunk elő nukleinsav preparátumot. Mint megállapítható volt, a magas hőmérsékleten tenyésztett törzsek nukleinsav mintáiból a dsRNS molekulák eltűntek. További terveink között szerepel a felfedezett dsRNS molekulák behatóbb vizsgálata és annak megállapítása, vajon ezek a dsRNS-ek okoznak-e változást a hordozó törzsek

fenotípusában illetve virulenciájában, mely megfigyelések hasznos információkat nyújthatnak biológiai kontroll elemként való alkalmazásukhoz.

A kutatómunka az OTKA F037663 számú, és az OMFB 00219/2002 pályázatának támogatásával készült.

ANTAL ZSUZSANNA¹, SZEKERES ANDRÁS², KREDICS LÁSZLÓ¹, MANCZINGER LÁSZLÓ², HATVANI LÓRÁNT², NAGY ERZSÉBET^{1,3}

Szaprofita *Trichoderma viride* törzsek mitokondriális DNS-ének polimorfizmus vizsgálata

¹MTA-SZTE Mikrobiológiai Kutatócsoport; ²SZTE TTK Mikrobiológiai Tanszék; ³SZTE OEK Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet, Szeged

A mitokondriális DNS extrakromoszómális genetikai elem, mely minden eukarióta sejtben megtalálható. A kromoszómális DNS-hez viszonyítva aránylag kis mérettel rendelkezik, mely tulajdonságának köszönhetően a mtDNS elemzése gombák összehasonlító tanulmányozásában széles körben elterjedt módszerré vált. A gombák mtDNS polimorfizmusának vizsgálatára egy egyszerű eljárás áll rendelkezésünkre, melyben a micéliumból kivont teljes DNS mintát olyan restriktív enzimekkel emesztik, melyek elsősorban a GC-gazdag DNS-t vágják. Ez a módszer a magi és a mitokondriális DNS eltérő GC-AT tartalmán alapszik. Gélelektroforézist követően a kismolekulasúlyú régióban elhelyezkedő, a magi DNS felaprózódásából származó folt mellett a sokpéldányos mtDNS viszonylag nagy fragmentumai jól látható mintázatot adnak.

A *Trichoderma* fajok elterjedt talajlakó fonalgombák. Gazdasági jelentőségüket részben gombaparazita képességüknek köszönhetik, mely lehetővé teszi növénypatogén gombák elleni biokontroll elemként való alkalmazásukat. A *Trichoderma* törzsek által termelt extracelluláris enzimek fontos szerepet játszanak a gombák megtámadásában és parazitálásában. Mindezekon túl, egyes törzsek kiemelkedő cellulóz-, és xilán bontó enzimek előállításában, mely tulajdonságukat a papír-, fermentációs-, és állati táplálék előállító iparban hasznosítják. Ugyanakkor, az elmúlt két évtizedben mind Európában mind Észak-Amerikában egyre több problémát okoz a termesztett gombák járványos megbetegedése, mely néhány *Trichoderma* nemzetségbe tartozó, igen agresszív biotípusnak tudható be. Kutatásunk célja, *Trichoderma* törzsek mtDNS-e RFLP mintázatának vizsgálata volt. Kísérleteinket magyarországi talajmintákból származó, morfológiai tulajdonságok alapján *T. viride* fajba sorolt törzsekre összpontosítottuk. Huszonkilenc izolátum micéliumából vontunk ki teljes DNS-t, majd a mintákat *Bsu*RI (GG/CC) illetve *Hin*6I (G/CGC) restriktív enzimekkel emesztettük. A *Bsu*RI kezelés eredményeként kapott különböző mtDNS RFLP mintázatok alapján ezek a törzsek öt mtDNS típusba sorolhatóak. A *Hin*6I enzimrel történt kezelés után kapott mintázat hasonló eredményt adott, és a törzsek besorolása a két enzim esetében azonos volt. Összefoglalóan elmondhatjuk, hogy eredményeink alapján a *T. viride* faj izolátumai közötti nagyfokú mtDNS polimorfizmust mutattunk ki. A továbbiakban tervezzük a mtDNS RFLP mintázatok más izolátumokban történő elemzését, valamint újabb enzimek vizsgálatokba való bevonását, melyek megerősíthetik a kapott mtDNS típusok létét, illetve új típusok felfedezését is vonhatják magukkal.

A kutatómunka az Országos Tudományos Kutatási Alap F037663, és az OMFB 00219/2002 pályázatának támogatásával készült.

ÁNYOS JÓZSEF¹, DITRÓI JÁNOS¹, TARR ÉVA¹, PANDUR JÓZSEF², *VERECZKEY GÁBOR³, HEGÓCZKI JÓZSEF³

A csemegekukorica gyártás szennyvizeinek tisztítása a debreceni szennyvíztisztító telepen

¹Debreceni Vízmű Rt., Debrecen; ²Investchem Kft., Érd; ³Központi Élelmiszer-tudományi Kutató Intézet, Budapest

Az EU-ban forgalmazott mélyhűtött csemegekukorica 50%-át Magyarországon termesztik. Az alapanyag feldolgozás - amelyet hűtő- és konzervipari cégek végeznek- során magas szervesanyag tartalmú technológiai vizek keletkeznek, amelyek a települések biológiai szennyvíz tisztítóinak üzemszerű működését felborítják, s emiatt a gyártókat jelentős szennyvíz bírsággal sújtják.

A termőhelyről betakarított, csöves csemegekukorica feldolgozásához tonnánként 6-7 m³ vizet használnak fel, amely a gyártósorról kikerülve erősen szennyezett, KOI értéke 5000±500 g/m³, azaz

közel négyszerese - a 204/2001. Kormányrendelet szerint - a csatornába bocsátásra előírt 1200g/m^3 határértéknek. A szennyvíznek jellemzően magas a szuszpendált szilárd anyag valamint, a szerves cukor és keményítő tartalma.

A kommunális szennyvíz feldolgozó telepek nem képesek a szükséges mértékben biológiailag lebontani ezt a szennyeződést, ha az ilyen víz az összes fogadott szennyvíz 10%-ánál nagyobb mennyiségben érkezik. Ha a település szennyvíz tisztító kapacitása a csemegekukorica feldolgozóktól szezon időszakban (július-szeptember) érkező víz fogadására nem képes, akkor vagy a tisztító művet kell a szükséges mértékben felbővíteni, vagy az üzemnek kell telepíteni egy szennyvíztisztító rendszert.

2002. év végén a Debreceni Vízmű Rt. döntési kényszer előtt állt a kukorica feldolgozó üzemek szennyvizeinek befogadása, illetőleg azokra helyi előtisztítás megépítésének kötelezése tekintetében. A szennyvíztisztító adottságait 2003. év tavaszán, illetőleg nyár elején sikerült technikai szempontból lényegesen bővíteni. Ez egyrészt a levegőbevitel növelését, másrészt az iszapfeldolgozás intenzifikálását jelentette.

A szennyvíztisztító adottságai bővítésének másik formája egy biotechnológiai fejlesztés. Az eleveniszapos biológiai tisztítót olyan speciális mikroorganizmusok (fonalas gombák, élesztők) keverékéből előállított starter kultúrával oltottuk be, amelyek az amilolitikus enzimrendszer mellett peroxidáz és oxidáz enzimekkel is rendelkeznek, így a keményítő és lignocellulóz tartalmú szennyezéseket is jó hatásokkal bontani képesek.

Hatására, valamint a már említett, viszonylagosan jobb oxigénellátás eredményeként a tisztítás a rendszerben kedvezőbbé vált. Az iszap elúszása az utóülepítőkből megszűnt. 2003 július-augusztusban a biológiai tisztítóba érkező szennyvíz KOI értéke 900 ± 400 , a rendszerből távozóé pedig $30\pm 20\text{ g/m}^3$, azaz a **tisztítási hatások $95\pm 3,5\%$** volt. A vizsgált időszakban a törvényben előírt tisztított vízre vonatkozó kibocsátási határértéket soha nem értük el.

A nitrifikáció is közel a határértékre, illetőleg a csemegekukorica feldolgozása előtti időszak értékére állt vissza. Az iszap kiüleptethetőségét biztosító, s ugyanakkor a megfelelő tisztításhoz, KOI eltávolításhoz szükséges 3-4 g/l iszapkoncentráció is tartható volt ezzel a rendszerben.

Mindezek együttes eredményeként a biológiai részre számítható tisztítási hatások jelentősen javult 2003-ban az előző évihez képest.

BAKONYI TAMÁS¹, FERENCZI EMŐKE², IVANICS ÉVA³, NORBERT NOWOTNY⁴

A Nyugat-nílusi vírus magyarországi törzseinek filogenetikai analízise

¹SZIE Állatorvos-tudományi Kar Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék; ²Johan Béla OEK Vírusdiagnosztikai Osztály, ³Országos Állategészségügyi Intézet, Budapest; ⁴University of Veterinary Medicine Institute of Virology, Vienna, Austria

A nyugat-nílusi vírus (West Nile Virus, WNV) magyarországi előfordulása régóta ismert, több mint harminc éve izolálták az első hazai törzseket rágcsálókból. Ennek ellenére klinikai tünetekben megnyilvánuló WNV fertőzésekről sem emberből, sem pedig házi- vagy vadon élő állatfajokból nem érkezett jelentés. Az utóbbi években mind több WNV járványkitörést írtak le a Mediterráneumban, Észak-Afrikában és a Közel-Keleten, emberekben, lovakban, házi- és vadmadarakban. A vírust 1999-ben behurcolták az Egyesült Államokba, ahol kezdetben New Yorkban, állatkerti és vadon élő madarak között idézett elő súlyos elhullásokat, majd később számos emberi megbetegedést is okozott. Azóta a vírus széles körben elterjedt és endémiássá vált az USA-ban is. Magyarországon 2003-ban állapítottunk meg először emberben és házilúdban idegrendszeri megbetegedésekhez vezető WNV fertőzéseket. A betegség klinikumában és járványtanában tapasztalt változásokra magyarázatot adhat a törzsek genetikai összehasonlítása. Egy 1972-ben, erdei pocokból és egy 2003-ban, házilúdból kimutatott WNV nukleinsav-sorrendjét hasonlítottuk össze a génbankban hozzáférhető szekvenciákkal. A '70-es években izolált vírus a WNV klasszikus, afrikai-, és eurázsiai törzsével mutatta a legközelebbi rokonságot. A 2003-as házilúd-járványból viszont az utóbbi években az Európában, a Közel-Keleten, Észak-Afrikában és az USA-ban izolált törzsekhez nagyon hasonló vírust mutattunk ki. Valószínű, hogy a korábbi évtizedekben Európában, és így Magyarországon is cirkuláló klasszikus törzseket fokozatosan egy új, nagyobb virulenciájú genotípus váltotta fel, amely időről-időre visszatérő emberi és állati megbetegedések előfordulását valószínűsíti hazánkban is az elkövetkező években.

BAKOS ÁGNES¹, BÁNÁTI FERENC¹, TAKÁCS MÁRIA², SALAMON DÁNIEL¹, FRITZ SCHWARZMANN³, HANS WOLF³, HANS HELMUT NILLER³, MINÁROVITS JÁNOS¹

DNS metiláció és protein-DNS kölcsönhatások vizsgálata látens Epstein-Barr vírus promóterek szabályozó régióiban c666 nazofaringeális karcinóma sejtekben

¹Johan Béla OEK Mikrobiológiai Kutatócsoport; ²Virologiai Főosztály, Budapest; ³University of Regensburg Institute for Medical Microbiology and Hygiene, Regensburg, Germany

A C666 nazofaringeális karcinóma sejt vonal látens Epstein-Barr vírus (EBV) genomokat hordoz. A virális genom BamHI C fragmentumára lokalizált C promóter (Cp, mely az EBNA 1-6 nukleáris antigének átírásáért felelős) ezekben a sejtekben inaktív. Ezzel szemben a BamHI Q fragmentumon elhelyezkedő Q promóter (Qp, mely az EBNA 1 mRNS transzkripciójáért felelős) aktív. Vizsgálatunk célja a Cp-t elcsendesítő és a Qp-t aktiváló epigenetikus mechanizmusok megismerése volt. Ezért nagy feloldású metilációs térképet készítettünk a Cp és Qp szabályozó régiókban a biszulfít-módszert alkalmazva. Vizsgálatunk célja a Cp-t elcsendesítő és a Qp-t aktiváló epigenetikus mechanizmusok megismerése volt. Ezért nagy feloldású metilációs térképet készítettünk a Cp és Qp szabályozó régiókban a biszulfít-módszert alkalmazva. A Cp működését reguláló szekvenciák erősen metilálóknak bizonyultak, a Qp regulátor régió viszont teljesen metilálatlan volt. A protein-DNS kölcsönhatásokat az "in vivo footprinting" módszerrel analizáltuk. Szemben az EBV genomokat hordozó limfoblasztoid sejt vonalakkal, melyekben Cp aktív és szabályozó régiójában a CBF1 celluláris fehérje tipikus "lenyomata" detektálható, C666 sejtekben az inaktív C promóterről a tipikus CBF1 "lenyomat" hiányzik. A Qp reguláló szekvenciák esetében a protein-DNS kölcsönhatások összehasonlíthatóak voltak a limfoid sejtekben észleltekkel. Fentiek alapján arra következtettünk, hogy a CpG dinukleotidok metilációja hozzájárulhat a C promóter kikapcsolásához C666 sejtekben. A tipikus CBF1 "footprint" hiánya arra utal, hogy a CBF1 protein nem kötődik e sejtekben felismerési szekvenciájához. Az erőteljes protein-DNS kölcsönhatások a Q promóter szabályozó régiójában arra utalnak, hogy Qp működését hasonló celluláris fehérjék szabályozzák limfoid és nazofaringeális karcinóma sejtekben.

BÁLINT BALÁZS^{1,2}, BAGI ZOLTÁN¹, TÓTH ANDRÁS², RÁKHELY GÁBOR^{1,2}, PEREI KATALIN¹, KOVÁCS KORNÉL^{1,2}

Állati eredetű hulladék, mint megújuló energiaforrás

¹SZTE TTK Biotechnológiai Tanszék; ²MTA SZBK Biofizikai Intézet, Szeged

Napjainkban komoly igény mutatkozik olyan eljárásokra, amelyekkel a különböző ipari műveletek során felhalmozódó szennyeződések lehet környezetbarát módon megsemmisíteni. A sertések, szárnyasok feldolgozása során például igen nagy mennyiségű szőr illetve toll hulladék keletkezik, mely természetes körülmények között lassan bomlik le. Munkánk arra összpontosít, hogyan lehet ezeket a szennyeződések - a környezetvédelmi szempontoknak eleget téve és gazdasági hasznot is termelve - bontani.

Tanszékünk korábban izoláltunk egy törzset, mely kiváló keratinbontó képességgel rendelkezik. Izolátumunkat *B. licheniformis* KK1 törzsként azonosítottuk. A baktérium extracelluláris keratin bontó proteázát, a keratinázt részlegesen tisztítottuk és jellemeztük. A keratintartalmú hulladék egészséges lebontásakor értékes aminosavak válnak szabaddá, melyeknek csak egy részét használja fel a bontó törzs, míg más része a degradáció során keletkező fermentálékban halmozódik fel, mely értékes tápanyagforrásként szolgálhat más - pl. fermentatív - mikroorganizmusok számára.

Számos mikroba a fermentatív növekedés során melléktermékként hidrogént termel. A második lépcsőben azt teszteltük, hogy van-e olyan mikroorganizmus, amely a keratin hidrolizátumot tápanyagként hasznosítva képes hidrogént termelni. Több, a laboratóriumban elérhető, potenciális hidrogéntermelő mikroorganizmus toll hidrolizátumon való növekedését és hidrogéntermelését nyomon követtük. Ezek közül a hipertermofil *Thermococcus litoralis*-szal biztató eredményeket értünk el: a különböző keratin tartalmú állati hulladékok bontásából származó fermentálék növesztett sejtek jóval több hidrogént termeltek, mint azok, amelyeket a hidrolizátumot nem tartalmazó minimál tápoldaton tartottunk.

Ezzel sikerült demonstrálni, hogy az állati eredetű keratin-tartalmú hulladékot egyrészt biológiai eszközökkel sikerrel tudjuk ártalmatlanítani, másrészt az így kapott termék energiatermelésre használható. A módszert sikerrel alkalmaztuk laboratóriumi kísérletekben, azonban a folyamatok

optimalizálása, léptéknövelése a jövő feladata.

BALKA GYULA¹, HORNYÁK ÁKOS², KECSKEMÉTI SÁNDOR³, KISS ISTVÁN³, SZABÓ ISTVÁN⁴, RUSVAI MIKLÓS¹

A sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómájának (PRRS) diagnosztikájában használt módszerek összehasonlítása

¹SZIE ÁOTK Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék; ²Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék, Budapest; ³Debreceni Állategészségügyi Intézet, Debrecen; ⁴Pfizer Animal Health, Budapest

A sertések reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómája (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS) magzatkárosodással, többnyire koraelléssel és légzőszervi tünetekkel járó, gyorsan terjedő, fertőző vírusos betegség. A fertőzés világszerte előfordul, Európa nagy sertéstartó hagyománnyal rendelkező országaiban az állományok jelentős része szeropozitív. Magyarországon szintén jelen van a vírus, jelenlegi adatok szerint állományaink mintegy 10%-a fertőzött.

A PRRS vírusa (PRRSV) a *Nidovirales* rend *Arteriviridae* családjába tartozó *Arterivirus* genus tagja. A burkos, pozitív irányultságú RNS genommal rendelkező vírust elsőként Hollandiában, a lelystadi állategészségügyi intézetben izolálták sertés alveoláris macrophag sejtvonalon, és ezért nevezték kezdetben Lelystadt vírusnak. Magyarországon elsőként 2000-ben a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék virológiai osztályán Medveczky és munkatársainak sikerült izolálnia a PRRSV-t, ezzel is bizonyítva a vírus jelenlétét hazai sertéstelepeken.

Jelenlegi kutatásaink során igyekszünk átfogó képet kapni a PRRS pontos hazai járványtani helyzetéről, az állományokban előforduló vírustörzsek filogenetikai tulajdonságairól, valamint a direkt- és indirekt diagnosztikai módszerek hatékonyságáról.

Munkánk során a már igazoltan fertőzött, vagy a betegségre jellemző tüneteket mutató állományok helyszíni vizsgálata alkalmával, vér-és ondómintákat gyűjtünk a beteg és tünetmentes állatokból, majd a szerológiai vizsgálatok eredményeinek tükrében RT-PCR módszerrel kíséreljük meg a vírusnukleinsav kimutatását. Ezzel párhuzamosan primer sertés alveoláris macrophag tenyészeteken próbálunk a mintákból PRRSV-t izolálni.

Eddigi eredményeink alapján négy, enyhe légzőszervi tüneteket mutató és szaporodásbiológiai problémákkal küzdő, PRRSV szeropozitív sertésállományból két esetben sikerült a vírus jelenlétét igazolni mind RT-PCR, mind vírusizolálási technikával.

A további vizsgálatok során, a PRRSV-re irányuló diagnosztikai munka mellett az általunk izolált vírustörzsek molekuláris szintű jellemzésével, és filogenetikai analízisükkel is szeretnénk foglalkozni.

BÁNÁTI FERENC¹, HANS HELMUT NILLER³, HANS WOLF³, KOROKNAI ANITA¹, MINÁROVITS JÁNOS¹, SALAMON DÁNIEL¹, TAKÁCS MÁRIA²

***In vitro* metiláció hatása az Epstein-Barr vírus eber-1 génjének expressziójára**

Johan Béla OEK ¹Mikrobiológiai Kutatócsoport; ²Virológiai Osztály; ³Regensburgi Egyetem, Orvosi-mikrobiológiai és Higiéniai Intézet, Regensburg, NSzK

A humán felnőtt populációnak több mint 90 %-a Epstein-Barr vírus (EBV) pozitív. A vírus számos kórkép kialakulásával hozható kapcsolatba, amelyek során többnyire látens formában perzisztál. A mintegy 100 látens génje közül az RNS-polimeráz III (Pol III) által átírt, fehérjét nem kódoló EBER-1 és -2 génjei mindig expresszálódnak. Antiapoptotikus, tumorigenikus hatásuknál fogva hozzájárulnak az EBV betegségokozó hatásához. Az általunk vizsgált sejtvonalakban korábban biszulfid szekvenálás módszerével megállapítottuk, hogy az EBER régióban található CpG dinukleotidok döntő többsége teljesen metilálatlan. Az RNS-polimeráz II (Pol II) által átíródó gének többségénél a promóter metiláltsága fordított arányban áll az adott gén aktivitásával, vagyis a régió metilálódása a gén inaktíválódását eredményezi. A Pol III által átíródó gének esetében ugyanakkor a DNS metiláció hatására vonatkozó, eddig publikált kísérletes adatok ellentmondásosnak bizonyultak. Ezért vizsgálni kívántuk, hogy az EBER-1 gén metilációja hogyan befolyásolja e gén transzkripcióját. Az EBER-1, -2 régiót tartalmazó PBS- plazmidot MSs1 CpG-metiláz enzimmal kezeltük. Az *in vitro* metilált és nem metilált konstruktot párhuzamosan transzfektáltuk Hela sejtvonalba. 48 óra múlva RNS-t izoláltunk mindkét sejtkultúrából, majd DN-áz kezelést követően gén-specifikus primerek segítségével reverz transzkripciót végeztünk, majd a termékből hígítási sort készítettünk. Az ezt követő PCR reakciókból

megállapítható, hogy a metilált konstruktról képződött EBER átiratok száma hozzávetőleg mintegy tizedét teszi ki a nem metiláltról átiródókének. Ezt az eredményt „real time” PCR-rel is sikerült alátámasztani. Ebből arra következtetünk, hogy a CpG metiláció gátolja az EBV EBER-1 génjének transzkripcióját.

BARNA BALÁZS

Hőkezeléses prediszpozíció hatása az árpa lisztharmat gombával szembeni ellenállóságára

MTA Növényvédelmi Kutató Intézet, Budapest

Különböző típusú rezisztenciagénekkel rendelkező közel-izogén árpa vonalak csíranövényeinek rövid idejű hő-sokk kezelése csökkentette ellenállóságukat lisztharmat (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) gombával szemben. Az árpa lisztharmat kapcsolatban a rezisztencia különböző formái fordulnak elő. Az úgynevezett M1a típusú rezisztencia esetében szemmel látható nagy nekrotikus léziók keletkeznek a fertőzés után; a hiperszenzitív reakció (HR) a mezofil sejtekre is kiterjed. Az M1g típusú rezisztens reakció csak a megtámadott epidermisz sejt elhalásával jár, hatékony sejtfalvastagodás, papilla képződés közben. Az előbb említett mindkét rezisztencia típus rassz (patotípus) specifikus, a gén a génnel szemben elméletnek megfelelően. A harmadik az m1o rezisztencia típus, amely nem jár hiperszenzitív reakcióval, de általánosan és 100%-osan hatásos minden lisztharmat rasszal szemben. Nyolc-tíz napos M1a, M1g vagy m1o rezisztenciagénnel rendelkező, illetve fogékony árpa csíranövényeket rövid időre hőkezeltük (49 °C, 20 sec) és néhány órával később lisztharmat gomba A6-os rasszával fertőztük. A gomba fejlődését fény- és UV epifluoreszcens mikroszkóppal követtük a levélszegmensek színtelenítése és a gomba festése után. Egy reaktív oxigén, a H₂O₂ felhalmozódását diaminobenzidin (DAB) segítségével mutattuk ki. Hőkezeléssel minden esetben csökkenteni tudtuk a rezisztenciát, ami a gomba fokozott fejlődésében (másodlagos csíratömlő, hausztórium) és a rezisztens reakciók (papilla képződés, epidermisz HR, H₂O₂ felhalmozódás az epidermiszben) csökkentésében nyilvánult meg. Mindemellett a szemmel-látható tünetek is a növények fogékonyságának szignifikáns fokozódását mutatták. A fogékonyság növekedés mechanizmusának megértésére membrán áteresztőképesség, antioxidáns, hő-sokk fehérje és DNS lebomlás vizsgálatokat végeztünk.

BECK ZOLTÁN, NAGY ETELKA, CSOMA ESZTER

Gyakori *P16^{INK4A}* ÉS *P14^{ARF}* gén deléció, valamint promoter metiláció HTLV-1 által fertőzött t-sejtvonalakban

DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Debrecen

Az INK4A/ARF lókuszt két olyan tumor-szuppresszor fehérjét kódol (*p16^{INK4A}*, *p14^{ARF}*), melyek aminosav sorrendje teljesen eltérő. A *p16^{INK4A}* a ciklin dependens kináz 4 és 6 aktivitását gátolja, ezáltal a retinoblasztoma fehérje hipofoszforilált marad; a *p14^{ARF}* a p53 útvonal szabályozásával a sejtciklust szintén a G₁/G₀ fázisban tartja. Ezen gének megfelelő expressziója nélkülözhetetlen a normális sejtciklus fenntartásához. Sok daganatos betegségben, így leukémiákban és lymphomákban is, megfigyelték ezen tumor-szuppresszor gének delécióját illetve promoter régióik metilációját, amely változások a gének expressziós szintjének csökkenését eredményezték. Vizsgálataink során meghatároztuk a *p16^{INK4A}* és a *p14^{ARF}* géneket érintő genetikai eltéréseket és a promoter régiókban bekövetkező metilációs változásokat 8 HTLV-1 fertőzött és 3 HTLV negatív T-sejtvonalban.

A *p16^{INK4A}* és a *p14^{ARF}* génekből bekövetkező deléciókat polimeráz láncreakció-egyszálú konformációs polimorfizmus (PCR-SSCP) technikával mutattuk ki. A *p16^{INK4A}* és a *p14^{ARF}* kódoló szekvenciáinak egy-illetve mindkét allélt érintő mutációit ABI automata szekvenátorral vizsgáltuk. A tumor-szuppresszor gének promoter metilációját metiláció-specifikus PCR (MSP) alkalmazásával határoztuk meg.

Az INK4A/ARF lókuszt delécióját, amely mindkét tumor-szuppresszor gén inaktiválását eredményezte, a 3 HTLV negatív és a belőlük kialakított összes HTLV fertőzött T-sejtvonalban ki tudtuk mutatni. A további 4 HTLV-t hordozó sejtvonalban INK4A/ARF deléció nem volt, és a szekvencia analízissel is csak heterozigóta mutációt találtunk a gének kódoló szakaszaiban. Ezen esetek közül háromban egyik vagy mindkét gén promoter régióinak részleges illetve teljes metilációját figyeltük meg. Az összes vizsgált sejtvonalat tekintve az MSP mindkét gén promoterét metilált állapotban mutatta ki 2 HTLV+

sejtvonalban, míg csak a $p14^{ARF}$ promoterét 4 esetben, és csak a $p16^{INK4A}$ promoterét 1 esetben. A perifériás vérből származó, negatív kontrollként használt T-sejtekben a vizsgált tumor-szuppresszor géneknek mind a genetikai, mind a metilációs státusza normális volt.

Ezek az adatok a HTLV-I fertőzés és az INK4A/ARF lókuszt metilációs inaktiválása közötti szoros összefüggést mutatják. A $p16^{INK4A}$ és a $p14^{ARF}$ fehérjék által szabályozott sejtciklus kontroll HTLV- okozta inaktiválása pedig egy fontos lépés lehet a sejtciklus deregulálásában és a vírus által okozott transzformációban.

BECZNER JUDIT, FARKAS JÓZSEF, HORVÁTH KINGA

Használati tapasztalatok nemzetközi prediktív mikrobiológiai szoftverekkel

Központi Élelmiszer-tudományi Kutató Intézet, Budapest

Prediktív mikrobiológiai eszközöket növekvő gyakorisággal alkalmaznak az élelmiszer mikrobiológiában, a kockázat becslésnél és a Veszély Elemzés, Kritikus Szabályozási Pontok kockázatkezelési rendszerekben. Ennek részben az az oka, hogy igény van a költséges és időt rabló „challenge tesztek” szükségességének csökkentésére a gyártmány- és gyártásfejlesztések során. Másrészt az, hogy elkerüljük korábbi kísérletek fölösleges megismétlését. Emellett az is szerepet játszik hogy a baktériumok élelmiszerekben való növekedésével kapcsolatos adatok számítástechnikai feldolgozásában is drámai fejlődés következett be. A *Food MicroModel* néven ismeretes, korábbi nagy brit adatgyűjteményre és egy hasonló, amerikai rendszerre, a *Pathogen Modelling Program*-ra támaszkodva a közelmúltban egy új, nemzetközi adatbázist létesítettek, ami a UK Food Standards Agency által támogatott norwich-i Institute of Food Research és az Egyesült Államok Mezőgazdasági Minisztériuma wyndmoor-i Eastern Regional Research Center nevű intézménye közös vállalkozása. E standarizált adatbázis, amit *ComBase*-nek neveztek el, sok-ezer szaporodási és túlélési görbét és hozzájuk tartozó egyéb információkat tartalmaz, amiket a két partner, továbbá egyéb intézmények állapítottak meg és sok adat származik a szakirodalomból is. A *ComBase* továbbfejlesztését anyagilag támogatja az Európai Bizottság is. A *ComBase* és a hozzá kapcsolódó szoftver csomagok az internetről letölthetők. Az adatkeresésre szolgáló *ComBase Browser* szoftveren kívül a *Growth Predictor* és a *Pathogen Modelling Program* szoftver-csomagok is rendelkezésre állnak, amelyekkel előre-becsülni lehet, hogy élelmiszerbiztonsági jelentőségű baktériumok miként szaporodnak különböző körülmények között. A *DMFit* és a *MicroFit* programok a *ComBase*-nek azon részei, amelyek görbe-illesztésekre szolgálnak a baktériumok szakaszos tenyészetek élősejt koncentrációja logaritmusának időfüggése modellezését illetően, a *Baranyi* és *Roberts* által 1994-ben publikált ún. dinamikus szaporodási modell alapján. Mindezek a szoftver programok hasznos eszközök döntés-hozás segítésére, de nem helyettesítik az élelmiszer-lánccal kapcsolatos tapasztalatokat és mikrobiológiai ismeretanyagot. A közelmúltban csoportunk is hozzájárult a *ComBase* adatbázishoz *Listeria monocytogenes* és *Lactococcus lactis* versengő szaporodásával kapcsolatos kísérleti adatainkkal és használtuk a *ComBase*-t és egyéb szoftverjeit különféle hűtött élelmiszerekre jellemző mikrobiológiai ökológiai környezeti paraméterek függvényében szerzett mikrobiológiai tapasztalataink és vizsgálati eredményeink validálására. A *Campden* és *Chorleywood Magyarország* intézménnyel együttműködésben pedig elkészítettünk egy felhasználóbarát útmutatót e prediktív mikrobiológiai eszközök élelmiszeripari és élelmiszervizsgálati gyakorlati hasznosítása érdekében.

BÉLAFINÉ BAKÓ KATALIN, GUBICZY LÁSZLÓ

Biokonverziók és membrános műveletek integrálási lehetőségei

VE Műszaki Kémiai Kutatóintézet, Veszprém

A biokonverziók megvalósítása során gyakran szembesülünk olyan jelenségekkel, amelyek gátolják a magas hozam elérését. Ilyen gondot jelenthet például a szubsztrát(ok) és/vagy termék(ek) eltérő oldhatósága, illetve az inhibíciós jelenségek. A problémák kiküszöbölésére manapság már sokféle, elsősorban elválasztástechnikai módszer alkalmazható. Ezek közül különös figyelmet érdemelnek a membrán szeparációs műveletek, kedvező tulajdonságaiknak (kíméletesek, hulladékmentesek, energiatakarékosak...stb.) köszönhetően. Laboratóriumunkban olyan integrált rendszereket

tanulmányoztunk, ahol a hatékonyabb működtetés érdekében a biokonverzióhoz egy membrános műveletet illesztettünk (in-line).

Elektrodialízist alkalmaztunk a fúmarsav – almasav *fumaráz* enzimmel történő átalakításánál, ahol a képződő ammónium malát oldatból nyertük ki az almasavat, mint terméket. A biokonverziónál ugyanis oldhatósági okokból a szubsztrátot só formájában kell adagolni, így a termék is só formájában képződik. Ennek kinyerése a hagyományos úton soklépéses, hulladékokat termelő folyamat, aminek kiváltására a környezetkímélő elektrodialízis kínál vonzó alternatívát.

Az aromaészterek előállításánál a *lipázos* észterezés során melléktermékként víz képződik, amely felhalmozódva gátló hatást gyakorol a biokonverzióra, ezért eltávolítása mindenképpen kívánatos. Az oldószermentes rendszerben pervaporáció alkalmazásával sikerült a reakcióelegy víztartalmát az optimális, állandó értéken tartanunk.

Trigliceridek metanollal való enzimatis (rögzített *lipáz* enzimet alkalmaztunk) átészterezése folyamán többféle gátló hatást kellett kiküszöbölnünk. Egyrészt a metanol erős szubsztrát inhibíciós hatást gyakorol az enzimre, ezért fokozatos adagolására különös figyelmet kellett fordítani, másrészt a keletkező glicerintről kimutattuk, hogy szintén gátolja az átalakítást. Eltávolítására dialízis lap modul alkalmaztunk, amelynek segítségével glicerint tiszta, vizes oldatát nyertük.

A trigliceridek *lipázos* hidrolízisét a szubsztrátok eltérő oldhatósága miatt emulziós rendszerben célszerű végezni. A fordított micelláris rendszer alkalmasnak bizonyult a biokonverzió megvalósítására oldott enzimmel, de gazdasági szempontból fontos volt az enzim visszanyerése, amit síknap rendszerű ultraszűrő membrán modul beiktatásával sikerült megoldanunk.

A biohidrogén előállítása és gázseparációs kinyerése több szempontból is különleges integrált rendszernek számít, hiszen itt élő mikrobával történik az átalakítás, s – a korábbi rendszerektől eltérően – gáznemű a kinyerendő komponens. A gázseparáció során a kb. 10 % hidrogén tartalmú elegyből kell kiindulnunk, s a kapilláris modul segítségével nyerjük ki és töményítjük az elegyet.

Összefoglalásként megállapítható volt, hogy a kíméletes membrános műveleteknek a biokonverziókhöz történő illesztésével nemcsak hatékonyabb átalakítás valósítható meg, hanem az integrált rendszerek sokszor környezetvédelmi és energetikai szempontból is előnyösebben működtethetők.

Köszönetnyilvánítás. A kutatómunkát részben a 20/2002 számú Békésy György Posztdoktori Ösztöndíj (2002-2005) és a 4/0026/2002 nyilvántartási számú NKFP (Széchenyi) projekt (2002-2005) támogatásával végeztük.

BELÁK ÁGNES¹, KISKÓ GABRIELLA¹, MOHÁCSINÉ FARKAS CSILLA¹, KUN SZILÁRD², REZESSYNÉ SZABÓ JUDIT², MARÁZ ANNA¹

A kompetitív mikrobiota vizsgálata bifidobaktériummal erjesztett sárgarépalében

¹BCE Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék; ²Sőr- és Szeszipari Tanszék, Budapest

Az utóbbi években a táplálkozástudományban egy új fogalom, a „funkcionális élelmiszerek” került bevezetésre. A probiotikus, prebiotikus és szinbiotikus élelmiszerek az emberi szervezetbe jutva a bélrendszer mikrokörnyezetének megváltoztatásával az ember egészségére kedvező hatást gyakorolnak. Napjainkban egyre gyakrabban alkalmazzák a *Bifidobacterium* nemzetséghez tartozó fajokat probiotikumként funkcionális élelmiszerek előállításához.

Feladatul tűztük ki sárgarépa lé bifidobaktériumos erjesztési módszerének kidolgozását, amelyre alapozva kísérleteket végeztünk a jellemző mikrobiota feltérképezése, populációs változásuk nyomon követése céljából.

A nyers, pasztörözött és sterilizált sárgarépa lé jellemző mikrobiotáját, majd pedig a fermentáció során ennek populációs változását tenyésztéses mikrobiológiai módszerekkel vizsgáltuk. Tekintettel arra, hogy a sárgarépa gyökérzöldség, a vizsgálatban az összcsíraszám mellett elsősorban a talaj eredetű szennyeződéknél várható mikroba csoportokra teszteltünk. A további vizsgálatokban faji szintű azonosítást végeztünk mikroszkópos és biokémiai vizsgálatok, valamint miniatürizált identifikációs tesztek segítségével.

A vizsgált mikroorganizmusok közül általában a kimutathatósági határ alatt fordultak elő szulfidredukáló klosztrídiumok, az *E. coli* és penészgombák. A kiindulási 37 °C-on szaporodó összcsíraszám 10^3 - 10^5 nagyságrendű volt, amelynek nagy részét az enterobaktériumok és a pszeudomonaszok tették ki közel azonos arányú megoszlásban. Lényeges volt még az élesztőgombák koncentrációja is. 100 sejt/ml alatt volt a spórás és a kólifórm, valamint a tejsavbaktériumok száma.

A nyers répaléből összesen 3 élesztőgomba és 48 baktérium izolátum vizsgálatát végeztük el. Mindhárom élesztőgombát *Candida famata*-ként azonosítottuk. A baktériumok azonosítását BBL CHRISTAL és API 20E, valamint API 20NE tesztekkel végeztük, amelynek eredményeként legnagyobb számban *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Pantoea* nemzetségbe tartozó fajokat kaptunk.

Ehhez a munkához az Oktatási Minisztérium az NKFP-4/0028/2002) számú projekt keretében támogatást nyújtott, amiért ezúton is köszönetet mondunk.

BELÁK SÁNDOR

A vírusos betegségek molekuláris diagnosztikája

Nemzeti Állategészségügyi Intézet és a Svéd Agrártudományi Egyetem, Uppsala, Svédország

Az összefoglaló előadás egy molekuláris diagnosztikai kutató- fejlesztő laboratórium két évtizedes tapasztalait ismerteti. A csoport a polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction, PCR) különböző változatait már 1988-ban használta és napjainkban kb. 35 "nested PCR" módszert alkalmaz a rutindiagnosztikában. A hamis pozitív és negatív PCR eredményeket speciális eszközökkel, valamint belső kontroll (mimic) molekulák segítségével sikerült kiküszöbölni. Napjainkban a "nested PCR" rendszereket "real-time" PCR rendszerekkel váltják fel, ilyenek a TaqMan, a Molecular Beacon, vagy a Primer-Probe Energy Transfer technikák. Különböző betegcsoportok komplex diagnózisára multiplex PCR rendszereket alkalmaznak. A diagnosztikai idő tovább rövidül azzal, hogy a "real-time" PCR gépekhez nukleinsav-tisztító és pipettázó robotokat kapcsolnak. Így a molekuláris diagnosztikai automatizálható, növekszik a víruskimutató rendszerek kapacitása, gyorsasága és megbízhatósága. A PCR termékek direkt szekvenálásával meghatározzák azok nukleotid-sorrendjét, majd következtetnek a vírus-variánsok rokonsági fokára. Ez lehetővé teszi, hogy meghatározzák a járványok vonulását, a vírusváltozatok terjedését (molekuláris járványtan). Annak érdekében, hogy a molekuláris diagnosztikát világszerte harmonizálják, az Office International des Epizooties (OIE) ötlépcsős validációs rendszerét követik. A laboratórium elsőként elnyerte az "OIE Referens Laboratórium a PCR Módszerek Alkalmazására az Állatorvosi Vírusdiagnosztikában" címet. Összegezve megállapítható, hogy a molekuláris diagnosztikai módszerek új perspektívát nyitnak a fertőző betegségek diagnosztikájában, beleértve a határokon áttörő (transboundary) betegségek, mint például a ragadós száj- és körömfájás, vagy a sertépestis diagnózisát. E módszerek bevezetése hozzájárul a zoonózis-esetek gyorsabb felismeréséhez, valamint javítja a biztonságosabb élelmiszer-termelés lehetőségét is.

BENCZIK MARTA¹, MATT J. LINDEMANN³, SARAH L. GAFFEN^{1,2,3}

A phosphatidylinositol-3' kinase szignál vizsgálata az ht-2 t sejtvonalban

¹Johan Béla OEK Vírusdiagnosztikai Osztály, Budapest; ²Department of Oral Biology, University at Buffalo, State University of New York, USA

Az antigén aktiválta T sejtek klonális szaporodását a citokinek, mint például az interleukin-2 (IL-2) közvetítik. Az IL-2 és az IL-2 receptor (IL-2R) szignál a sejt szaporodását indukálja a sejtciklus előre mozdításával a G1 fázisból. Az IL-2R-nak legalább három különböző, proliferatív szignálját ismerjük, a STAT5, a p38-MAPK és a phosphatidylinositol-3' kinase (PI3-K). Mégis ezen szignálok relatív fontossága még nem tisztázott. Az IL-2 függő T sejtvonal, az HT-2 hasznos modellnek bizonyult az IL-2 szignál vizsgálatára T sejtekben. Ámbár manapság több humán, és rágcsáló T sejtvonalban a PI3-K szignál állandó jelleggel aktívnak bizonyult, így szerepét több szignálfolyamatban alulbecsülték. Ezért lett vizsgálatunk tárgya a PI3K szignál, és kimutattuk, hogy az HT-2 sejtekben nem magas phosphatidylinositol- (PtdIns) phosphat (PtdIns(3,4)P₂ or PtdIns(3,4,5)P₃) bazális szintje, és nem defektívek ezen lipideket lebontó enzimekben, mint a phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) és a SH2-domain containing inositol polyphosphatase (SHIP). Míg a PI3-K szignálfolyamat upstream összetevői (PI3-K, PTEN, SHIP) normálisan szabályozottak, az Akt (egy serine/threonine kinase, a PI3K szignál leggyakoribb downstream komponense) nem jelentősen aktiválódik ezekben a sejtekben. Ezen kívül a szokásos Akt target molekulák, a GSK-3β és a Bcl-2 sem szabályozódnak az Akt által ezekben a sejtekben. Ellenben, azt találtuk, hogy az Akt homológ, a serum

glucocorticoid-inducible kinase (SGK) erősen aktiválódik IL-2 hatására, és az SGK target fehérjéi közül a FOXO1 nem az Akt-re, hanem az SGK-ra jellemző foszforilálódási mintázatot mutat. Tehát az HT-2 sejtekben az IL-2 indukálta PI3-K szignál egyik komponense elsősorban az SGK és nem az Akt. Tehát feltételezhető, hogy a PI3-K szignálfolyamatok sejtípusokon belüli eltérései szerepet játszhatnak a citokinek, mint az IL-2 szignál specificitásában.

BENKŐ MÁRIA¹, SOMOGYI VIRÁG¹, DOSZPOLY ANDOR¹, LAPATRA SCOTT E.², HARRACH BALÁZS¹

Molecular study of a herpesvirus isolated from white sturgeon

¹Hungarian Academy of Sciences Veterinary Medical Research Institute, Budapest; ²Center for Fgon State University, Corvallis, USA

Fehér tokhalból (*Acipenser transmontanus*) többször izoláltak már herpeszvírust, azonban genom-szintű vizsgálatokat eddig még nem végeztek ilyen vírussal. Amerikai együttműködésben megkezdtük egy természetes vízben fogott, egészséges, felnőtt, nőstény tokból izolált herpeszvírus törzs molekuláris jellemzését. A véletlenszerű klónozás és PCR segítségével nyert genomszakaszok bázis-sorrendjét meghatároztuk, és homológia kereső program alkalmazásával azonosítottuk a kódolt géneket. A GénBankban talált szekvenciák közül a pettyes harcsából (*Ictalurus punctatus*), lazacfélékből illetve békából (*Rana pipiens*) izolált herpeszvírusok bizonyos génei mutatkoztak az általunk vizsgált gének közeli rokonának. A felsorolt vírusok közül egyedül az ictalurid herpeszvírus teljes (mintegy 134 ezer bázispár méretű) genomja ismert, ezért ennek a genetikai térképére vetítve próbáltuk meg az acipenserid herpeszvírus megismert génszakaszainak egymáshoz viszonyított elhelyezkedését meghatározni. A feltételezett térkép alapján PCR primereket terveztünk további genomszakaszok izolálásához. Eredményeink világosan mutatják, hogy az acipenserid herpeszvírus az eddig jellemzett többi hal- illetve béka-eredetű herpeszvírussal közös leszármazási vonalat képvisel. E vírus csoport rendszertani besorolása a jelenlegi Herpesviridae családba nem lehetséges a homológ gének hiánya miatt. A különféle értékes halfajokban számos olyan megbetegedés ismert, amelynek feltételezett kórokozója herpeszvírus. Az általunk vizsgált izolátum esetleges kórtani szerepét az Egyesült Államokban vizsgálják. További genom vizsgálataink célja egyrészt a gyakorlatban is alkalmazható, specifikus és érzékeny diagnosztikai módszer kidolgozása, másrészt újabb bizonyítékokat kívánunk szolgáltatni e vírusok helyes rendszertani besorolásának megalapozásához.

Although herpesviruses have repeatedly been isolated from white sturgeon (*Acipenser transmontanus*), the genomes of these viruses have not been studied before. We initiated the molecular characterisation of the genome of a herpesvirus strain isolated from a free-living, healthy, adult, female sturgeon. The DNA sequence of genome fragments, obtained by random cloning and PCR, was determined and the genes encoded were identified by homology search programs. The most closely related genes retrieved from the GenBank were those from herpesviruses isolated from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*), different salmonid fish, or frog (*Rana pipiens*). From these viruses, full genomic sequence is available from the ictalurid herpesvirus only. Therefore, estimation of the relative position of the partial or entire genes identified from the acipenserid herpesvirus was attempted by projecting them on the genome map of the ictalurid herpesvirus. Based on this hypothetic genetic map (of approx. 134 kbp in size), PCR primers were designed for the isolation of additional genome parts. Our results clearly demonstrated that the acipenserid herpesvirus belongs to the lineage comprised by herpesviruses originating from other fish species and frog. In lack of homologous genes, taxonomical classification of this group of herpesviruses within the family Herpesviridae is not possible. Herpesviruses are suspected causative agents of severe disease manifestations in a number of valuable fish species. The eventual pathogenic role of this particular acipenserid herpesvirus isolate is being studied in the USA. We plan to continue the genome studies to facilitate the elaboration of specific and sensitive diagnostic methods that can be applied in the practice. Moreover, we also aim at providing further support for the correct classification of these, yet unassigned herpesviruses.

BERENCSI GYÖRGY

Megemlékezés Farkas Elekről

Johan Béla OEK Virologiai Főosztály, Budapest



Farkas Elek dr. 2004 január másodikán, életének 93. évében eltávozott az élők sorából.

Tisztelettel emlékeznek rá a barátok, tanítványok és tisztelők. Dr. Farkas Elek emberi és szakmai nagyságára emlékezünk. Életének, bölcsességének és munkájának eredményei, alkotásai folyamatosan jelen vannak a magyar tudomány és a magyar virológia hétköznapijaiban valamint tanítványai és munkatársai alkotásaiban is.

Ő maga is nagy emberek tanítványa volt. Kiemelkedő szerepet játszott közöttük nagybátyja, Farkas Géza, aki az Orvosegyetem élettan tanára volt. Stasiák Aranka, aki az Országos Közegészségügyi Intézet munkatársa volt és Johan Béla, akinek Farkas Elek volt az egyik legmértöbb munkatársa és tanítványa.

1936-ban került először az Országos Közegészségügyi Intézetbe, majd rövid időre elkerült a nagyváradai egyetemre. Johan Béla javaslatára Ungvárra küldték és nevéhez fűződik a hazai kiütéses tífusz védőoltás kidolgozása és a rendszeres gyártásmegindítása.

Takátsy Gyula dr.-ral kimutatták, hogy a német kiütéses tífusz védőoltás rossz. Új kórokozókat tenyésztettek ki és hatékony védőoltást gyártottak. Ennek a vakcinának köszönhetjük hogy Magyarországon az utolsó megbetegedés 1971-ben fordult elő. Az ő idejében a kiütéses tífusz gyógyíthatatlan betegség volt. Kutatói bátorságát bizonyítja, hogy mertek ezzel a kórokozóval dolgozni. Itt volt életében talán egyetlen egyszer szerencséje, mert szemben munkatársaival tünetmentesen vészelte át a betegséget.

Két dolog határozta meg az életét. Nemzetközi rangú virológus iskolát teremtett Magyarországon, és soha sem saját magát menedzselte, hanem munkatársainak az útját egyengette egész életén keresztül. E sorok írója is neki köszönheti, hogy Debrecenből az OKI-ba kerülhetett.

1966-ra 8 tudományos minősítéssel rendelkező munkatársa volt a Virologiai osztálynak, pedig mindenki gyakorlati tudományos kérdésekkel foglalkozott az Osztályon. Farkas Dr. ugyanazt vallotta mint Louis Pasteur: csak olyan dolgokkal szabad foglalkozni, aminek kézzelfogható haszna van a társadalom és a betegek számára.

A Richard N. Taylor által bevezetett, majd abbamaradt influenza diagnosztika újraindítását és megjavítását tette lehetővé a Takátsy féle mikrotitrátor kifejlesztése. Nélküle talán meg sem valósulhatott volna a felfedezés, ami a világ legelső laboratóriumi mikromódszerének bizonyult.

Vezetése alatt készült el az első hazai influenza védőoltás, az első 4 millió ember számára elegendő gyermekbénulás elleni védőoltás. 1965-ben pedig megjelent az első hazai virológiai kézikönyv, a páratlan Orvosi Virologia, amit ő szerkesztett és a munkatársai írtak meg.

Egész életében azon munkálkodott, hogy a hazai tudomány helyzete javuljon. Alapító tagja volt a Magyar Mikrobiológiai Társaságnak, amely akkor a Magyar Tudományos Akadémia Támogatásával működött. Több mint másfél évtizeden át ő volt a társaság főtitkára, akire a fáradtságos munka jelentős része hárult. Munkáját a Társaság vezetősége azzal ismerte el, hogy kitüntette a Manninger emlék éremmel, amelynek a megalapításában ő maga is tevékenyen részt vett. Amikor leköszönt a főtitkári funkcióról a társaság megválasztotta Örökös Főtitkárának.

Elérték Ivánovics György professzorral, aki a Társaság Elnöke volt, hogy az MMT belépessen a IUMS-ba azaz a Mikrobiológiai Társaságok Nemzetközi Egyesületébe. Részben ennek köszönhető, hogy 1972-ben a 2. Nemzetközi Virologiai Kongresszus Magyarországon került megrendezésre. Ezt a lehetőséget többek között annak is köszönhetette az ország, hogy az OKI Virologiai osztálya számos szakmai területen világszínvonalú kutatómunkát végzett (influenza, enterovírusok, arbovírusok, szövettenyésztés és LCM).

Nem kis szerepe volt abban, hogy a Magyar Tudományos Akadémia által támogatott és alapított angol nyelvű szakmai folyóiratok között megindult az Acta Microbiologica Acad. Sci. Hung., folyóirat is

aminek egy évtizeden át szerkesztője volt, majd a szerkesztőségi munkát Dömök István dr. vette át ő maga azonban több évtizeden át volt a folyóirat szakmai lektora, bizonyítva hogy nemzetközi színvonalon beszélt nyelveket és ismerte a szakmát.

Az Acta Virologica szerkesztőbizottsági tagja volt. Tagja volt számos minisztériumi és akadémiai szakbizottságnak valamint a genfi WHO Központ Vírusbetegségek Szakértői Csoportjának.

Sajnálatos, korai nyugdíjba menetele előtt Nász István professzorral még egy jelentős kísérletet tett arra, hogy a virológia, mint szakma különös tekintettel a biotechnológia fejlődésére nagyobb állami támogatásban részesüljön. Ez azonban sajnos mind a mai napig várat magára.

Nyugdíjba menetele után sem szakadt el a virológiától. Szaktanácsadóként részt vett a hazai vérellátó szolgálat virológiai laboratóriumának a kialakításában. Szakmai szerepe volt abban, hogy a hepatitis B vírus hordozó véradókat a szakmailag legjobb minőségű reagensekkel szűrjék ki.

Korai nyugdíjaztatásának egyetlen haszna volt. Szeretettel és türelemmel részt tudott venni évtizedeken át unokáinak nevelésében. Hetvenéves születésnapját követően újra résztvevője lett a Magyar Mikrobiológiai Társaság nagygyűléseinek és kongresszusainak. Együtt ünnepelte velünk a Társaság 50-éves jubileumát és a Társaság megünnepelte Örökös Főtitkárának a nyolcvanadik születésnapját és Dömök István, Hollós Iván, Karasszon Dénes, Koch Sándor és Simon Miklós 75. valamint Koller Miklós 70.-ik születésnapját.

Harminckét éven át élt nyugdíjasként. A közegészségügy szégyene, hogy nem dolgozhatott személyi és pozicionális okokból tovább mint az intézmény vezetőinek egyike, hiszen még az elmúlt 5 év folyamán is összefoglalta az Egészségtudomány című folyóiratban, három közleményben, a hazai orvosi virológia kezdeti lépéseinek történetét, amiben neki személy szerint elévülhetetlen érdemei voltak. (A kézirat Dömök István 2000 április 1-én tartott köszöntője alapján és Mészáros János temetői emlékbeszéde felhasználásával készült.)

BERENCSI GYÖRGY

Rövid méltatás Dömök professzor szakmai pályájáról

Johan Béla OEK Virológiai Főosztály, Budapest



Dömök István 1950 november 14-ikén lépett be az Országos Közegészségügyi Intézetbe, mint frissen végzett orvos. A virológiai osztályon dolgozott folyamatosan. Részt vett az osztály diagnosztikai, oktatási, kutatási és szakmai irányítási feladataiban.

Farkas Elek, Takátsy Gyula, Fornos Ferenc és Molnár Erzsébet képezték a virológiai osztály vezető munkatársait és tanult Erdős Lászlótól és Petrilla Aladártól. Makara György, Székács István, Zoltai Nándor, Fűrész István, Újhelyi Károly, Habán György és Eörsi Mária, Csillag Anna majd Novák Ervin Károly voltak a rokon osztályok vezetői ill. vezető munkatársai az intézetben.

Kortársai voltak Koch Sándor, Schulek Elemér, Hollós Iván, Ruzicska Péter, Simon Miklós, Szöllőssy Ervin és Horváth Sándorné az első évtizedekben.

Ő személy szerint az influenza vírus diagnosztikával, és a hazai enterovírus diagnosztika megalapozásával dolgozott 1958-ig, amikor a "C" épületben megvalósult az első nagy laboratóriumi fejlesztés lehetővé téve a poliomyelitis, az influenza és a mumps védőoltások termelését.

A folyamatos és majomvese szövettenyészetek bevezetése lehetővé tette a gyermekbénulás megbetegedések virológiai kivizsgálását.

Bevezették a szövettenyésztést, megkezdtek az enterovírusok virológiai vizsgálatát.

A coxsackie vírusok kórokozó képességéről írta, és egyike volt a legelső virológusoknak, akik felvetették annak a lehetőségét, hogy a cukorbetegség egyik formáját. Vizsgálta annak lehetőségét, hogy a coxsackie vírusok súlyosbíthatják a gyermekbénulás megbetegedést. Részt vett az 1957-es és 1959-es poliomyelitis járványok virológiai vizsgálatában és alaposan kivizsgálták az 1958. évben lezajlott óriási Bornholm betegség járványt, kimutatva, hogy a coxsackie B3 vírus interferál a gyermekbénulás vírussal, és bizonyos valószínűséggel szerózus meningitist is tud okozni azaz 300 ezer bordaközi ideggyulladás megbetegedésre 2000 agyhártyagyulladás jutott.

Mind a mai napig azt a törzsgyűjteményt használjuk, amelyet Dömök Dr. állított össze, és ő termelte

többször nyúl immunizálásával azokat az immunsavókat, amelyeket még ma is lehet alkalmazni a referencia laboratórium feladatainak az ellátásához.

Kandidátusi értekezését 1962-ben védte meg.

Volt többször Moszkvában a ma Csumakovról elnevezett Poliomyelitis intézetben előadást tartani. Nyugateurópai körúton vett részt a gyermekbénulás védőoltással kapcsolatos kérdések tanulmányozása céljából. Volt az NDK-ban tanulmányúton és előadást tartott a WHO Európai Poliomyelitis Symposiumán 1966-ban.

1967 január 1-e nagy nap volt az általa vezetett enterovírus laboratórium életében, mert az Egészségügyi Világszervezet kijelölte a laboratóriumot enterovírus referencia laboratóriumnak. Mindez az ő személyes teljesítményének és munkacsoportja szorgalmának valamint Farkas Elek támogatásának az eredménye volt.

Az ő felfedezése volt, hogy a gyengített Sabin védőoltástól is lehet bénulással járó megbetegedést kapni. Ő irányította az első szeroepidemiológiai szűrést Magyarországon, ami bebizonyította a világnak, hogy az élő gyengített vírus magas szinten tartja a lakosság védetségét. Az Egészségügyi Világszervezet megteremtette annak lehetőségét, hogy majmokat, készülékeket reagenseket és módszereket alkalmazzunk, amire az akkori anyagi lehetőségek sem adtak lehetőséget.

Középiskolás korában olaszul és németül tanult. A Farkas dr. mellett eltöltött évtized tette lehetővé, hogy kiválóan megtanuljon angolul. Ő lett a Farkas dr. közreműködésével megalakult Acta Microbiologica Hungarica technikai szerkesztője több mint egy évtizedre. Ő volt a hazai Poliomyelitis Bizottság titkára, ő lett az MTA Chlamydia Bizottságának vezetője.

A WHO együttműködés tette lehetővé, hogy a munkacsoport részt vegyen a lengyelországi gyermekbénulás oltással kapcsolatos baleset vírusainak a vizsgálatában, a közel-keleti gyermekbénulás vírusainak a vizsgálatában, a poliovírusok genetikai vizsgálatára alkalmas módszerek összehasonlításában. Én magam is ennek a munkának köszönhetem, hogy olyan módszereket tanulhattam meg, amelyeket a Szegedi Biológiai Központban tudtak csak egy évtizeddel később bevezetni.

A munkának két kiemelkedő eredménye lett.

Magyarországra került a 2. Nemzetközi Virologiai Kongresszus ami az akkori korszak első és legnagyobb olyan kongresszusa volt, amin taiwani, dél-afrikai, izraeli résztvevők is bejöttek egy szocialista országba. A Magyar Mikrobiológiai Társaság, amelynek ő is alapító tagja volt, húsz évi fenntartási kiadásra elegendő bevételre tett szert a kongresszus következtében. A csaknem 1000 résztvevő valamennyi hazai és kelet-európai virológus számára lehetővé tette, hogy angolul tanuljanak, nyugati szakemberek előadásait halgassák és egymással tömegméretekben találkozhassanak.

Ezen a ponton köszönetet kell mondani Péter János külügyminiszternek, aki megértette a szakmai értékét a kongresszusnak és kijárta az engedélyt a "tiltott államok virológusainak" a bejövetelére. Számomra ez teremtette meg a lehetőséget, hogy mind kelet-európai, mind nyugat-európai virológusok megjegyezték a nevemet, pedig nem is tartottam előadást a kongresszuson.

A másik nagy eredmény volt, hogy a WHO kijelölte Dömök Dr-t a Kelet-Afrikai WHO Laboratórium vezetésére 1969 és 1972 között. Néhai M. Balayan volt a munkatársa aki később bebizonyította, hogy a hepatitis E vírus emberi klinikai megbetegedéseket is tud okozni. A feladatuk az volt, hogy megvizsgálják, miért hatástalan a Sabin védőoltás a trópusi országok lakossága számára.

Nagyon eredményesen dolgoztak és az Idi Amin fenyegető diktatúrája akadályozta meg, hogy a WHO-magyar-ugandai együttműködés tovább folytatódjék.

Az egész afrikai lakosság tragédiája ez, mert az Entebbében működő laboratórium felismerhette volna az afrikai AIDS járvány kezdetét már az 1970-es években. Ez a tapasztalat és élményanyag tette számára fontossá a HIV/AIDS megelőzést a későbbi években.

Az védőoltáshoz társuló gyermekbénulás megbetegedések felismerése miatt és az afrikai teljesítménye alapján javasolta őt Albert B. Sabin a WHO gyermekbénulás védőoltásokat felügyelő bizottságába, és a "Vírusbetegségek szakértőjeként a WHO Konzultációs Bizottságába". Ennek a feladatnak a szerves folytatása volt, hogy a 80-as évek végén beválasztották a WHO gyermekbénulás igazolására hivatott bizottság tagjának. 2002-ben ő volt az egyik aláírója az Európát gyermekbénulás mentesnek nyilvánító dokumentumnak. Nagy jelentőségű szakmai siker ez!

Hazaérkezését követően Farkas Dr. utódja, majd rövidesen főosztályvezető lett. A virológiáról epidemiológussá változott. Korábban tanácsadója volt éveken keresztül a Szt. László Kórház virológiai laboratóriumának. 1995 után a Petrilla Aladár és Rudnai Ottó utódja lett.

A Magyar Mikrobiológiai Társaságban és mind az Infektológiai mind a Mikrobiológiai Szakmai Kollégiumban évtizedeken át dolgozott. Ő volt az elnöke az OKI-ban működő WHO AIDS együttműködési központnak. A Magyar Mikrobiológiai Társaság és a Magyar Higiénikusok Társasága vezetőségének. Tíz éven át volt a főtákarója a Magyar Mikrobiológiai Társaságnak, ami egyben 10 kongresszus és nagygyűlés megszervezését is jelentette. Az MTA és az Egészségügyi Minisztérium Járványügyi és Oltóanyag Bizottságának. Főigazgató helyettes főorvos lett 1986 azaz Rudnay professzor elhunytát követően.

Az Országos Intézet főigazgató helyettese volt 1986-tól mindvégig, amikor a HIV/AIDS megelőző rendszabályokat bevezették Magyarországon. Az Egészségügyi Minisztérium, Dr. Földes István és Dr. Hollán Zsuzsa valamint az ő munkájának köszönhetjük, hogy a HIV/AIDS járványügyi helyzete ma is a legjobbak közé tartozik a világon. A terhesek hepatitis B szűrését valamint a serdülő korosztály aktív hepatitis B védőoltását is az ő közreműködésével vezették be. A hepatitis perinatális átvitelét a program 25-45 %-ról (Ordog és mts. *J. Med Virol.* 70/2, 194-204, 2003) 1 % alá csökkentette. A hazai szakorvosképzésben elvülhetetlen érdemei vannak. Minden hazai virológus képzésében és pályáiknak egyengetésében szerepe volt. Számos szakmai és állami kitüntetéssel ismerték el munkásságát. Mind az OTH mind a Johan Béla OEK saját halottjának tekinti. Mindez azonban eltörpül a tanítványok, kollégák, barátok hálája és megbecsülése mellett.

BERTA BRIGITTA¹, SIPOS RITA¹, SZÉKELY ANNA¹, BUJDOSÓ LÁSZLÓ², HAJDÚ CSABA², SZARVAS JÓZSEF², MÁRIALIGETI KÁROLY¹

Gombakomposztból izolált mikrobák DNS alapú azonosítása, biokémiai és élettani vizsgálata

¹ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszék, Budapest; ²Quality Champignons Kft. Fajtakutató Laboratórium, Demjén

A megfelelő minőségű komposzt a hatékony gombatermesztés alapja. Ezért a komposztálás folyamata során lejátszódó fizikai, kémiai és esetünkben leginkább érdekes biológiai változások, az ezeket létrehozó mikroorganizmusok megismerése, valamint potenciális komposzt-oltó törzsek keresése izgalmas kihívást jelent. Nemcsak a gombatermesztés gazdasági vonatkozásai lényegesek, hanem a komposzt, mint extrém élőhely elemzése is, ahol a magas hőmérséklethez és annak gyors változásához a mikrobaközösségnek folyamatosan alkalmazkodnia kell. A gombakomposztálás biológiailag három fázisra osztható. Az első mezofil szakasz, ahol az alapanyagokat (szalma, gipsz, csirke- és lótrágya) halmokba rendezik, rendszeresen forgatják és öntözik. Itt történik a legkönnyebben bontható energiaforrások (egyszerű cukrok, lipidek, keményítő és fehérjék) hasznosítása. A mikrobaközösséget főleg a kiindulási anyagokra jellemző baktériumok és gombák alkotják. A fokozott lebontás jelentős hőtermeléssel, pH változással jár, ezért ez a kezdeti közösség hamar háttérbe szorul. A második szakasz egy termofil fázis, itt történik a komposztálás szempontjából fontos biopolimerek lebontása. A folyamat meghosszabbítására valamint az anaerobitás elkerülésére a komposztot levegőztetik. A minél hatékonyabb degradáció érdekében ebben a szakaszban nyílik lehetőség speciális oltó törzsek alkalmazására. A komposzt lehűlése után hőkezelő alagútba kerül, aminek szerepe a patogének eliminálása és a csiperke (*Agaricus bisporus*) szelektivitásának biztosítása. Az oltásra kész komposztot mezofil, magas hőmérsékletet is túlélő zömében spórás mikroba nemzetségek jellemeznek. Munkánk során mindhárom fázisból mintát vettünk, ezeket homogenizáltuk, majd hígítási sorokat készítettünk, amelyeket húspepton és komposzt táptalajon szélesztettünk. A lemezeket 45°C, 50°C és 55°C-on inkubáltuk, majd ezekből izoláltunk és tiszta tenyészeteket állítottunk elő. A törzsekből DNS-t izoláltunk, PCR technikával felszaporítottuk a 16S rDNS gént, ezt szekvenáltuk, majd a törzseket adatbázis segítségével azonosítottuk. Ezután megállapítottuk az izolátumok pH és hőmérséklet optimumait. Teszteltük a törzsek biopolimer lebontó képességét cellulóz, karboximetil-cellulóz és xilán hasznosítási vizsgálatokkal valamint nitrifikáló és denitrifikáló képességüket mivel a természet csiperke ammónia érzékeny. Kutatásunk során a termofil fázisban találtuk meg a komposztból leírt *Thermobifida cellulolyticát* és *T. albat*, a *Bacillus* nemzetség cellulóz bontására képes fajait (*B. clausii*, *B. mojavensis*, *B. licheniformis*) valamint az észteráz és ureáz aktivitással rendelkező *Ureibacillus* nemzetség két, eddig ismeretlen tagját. Minden fázisban az izolált törzsek többsége hőforrásból azonosított *Pseudoxanthomonas taiwanensis* rokonsági körébe tartozott. Várakozásainknak megfelelően az izolátumok többsége a vizsgált biopolimereket bontotta. Eddigi eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a *Pseudoxanthomonas* nemzetség tagjai kulcsszerepet játszanak a gombakomposzt kialakításában.

BIRÓ BORBÁLA¹, FÜZY ANNA¹, MOLNÁR EDIT²

A tollas szálkaperje termőhely-körülmények által befolyásolt rhizobiológiai tulajdonságai

¹MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézet, Budapest; ²MTA Ökológiai és Botanikai Kutató Intézet, Vácrátót

A tollas szálkaperje (*Brachipodium pinnatum* /L/P.B.) dominanciáját, morfológiai tulajdonságainak változását (MOLNÁR 2003) és mikroszimbiontas kolonizációját vizsgáltuk eltérő fényklímájú (teljes napfény, félárnyék, árnyék) élőhely típusokban. Összefüggéseket kerestünk a mikroba partner infekciója és a fűfaj elterjedési mintázata, illetve egyéb növény-fiziológiai tulajdonságok között három gyeptípusban, ami az egykori erdőirtás után kialakult háromféle (cserjés, sztyeppesedett, fa alatti) állapotnak feleltethető meg.

A 2001-es vegetációs évben májustól októberig 4 alkalommal vettünk növény és talajmintát 15x15x25 monolit mintavevővel. A növény morfológiai és számossági jellemzői közül a hajtás- és levélszámot, a tarackon levő rügyek és a tarack-elágazások számát, a hajtás magasságát és biomasszáját, valamint a levélterületet (Li-Cor 3000 műszerrel) mértük. Az arbuskuláris mikorrhiza gombák (AMF) kolonizációját fénymikroszkóppal vizsgáltuk növényenként 30-30 gyökérszakasz anilin-kékes festése után. Az infekciós gyakoriság mellett (M%), az adott gyökérszakaszra és az egész gyökérrendszerre kalkulált relatív és abszolút arbuszkulum gazdagságot (a%, A%) is értékeltük (FÜZY és mksai 2003). Az adatok normalitását Kolmogorov-Szmirnov próbával ellenőriztük, majd egy- és kéttényezős ANOVA-val és a STATGRAF 5.0 verziójával értékeltük.

A vizsgált termőhelyi abiotikus jellemzők között a fényklíma évszakos és napszakos dinamikájában jelentkeznek leginkább eltérések a típusok között (MOJZES et al. 2003). A fénykitettségi mértéke és hossza jelentősen befolyásolta az AMF kolonizáció alakulását is. Mind a mikorrhizáció mértékében (M%), mind annak működőképességében (A%) szignifikáns eltérések adódtak a termőhely-típusok között, ami befolyásolta a gazdanövények morfológiai, fiziológiai tulajdonságait is. A biomassza és a mikorrhizáltsági adatok maximális értékei a félárnyékos élőhelyen alakultak ki. A fényszegény, árnyékos helyen a rügybank elemeinek megoszlása (MOLNÁR 2003), a mikorrhizáltság időbeli lefutása és a szezonális dinamika is eltért. Ezen, a leginkább stressznek kitett élőhelyen ugyanakkor a gazdanövény mikroszimbiontától való függősége erősebben jelentkezett, amit jelzett, hogy a mikorrhizás kolonizáció maximuma megelőzte a biomassza-termelődés legnagyobb, szeptemberi értékét. Az árnyékos, fa alatti területeken a lényegesen alacsonyabb biomasszához viszonyított nagyobb számú mikroszimbiontas struktúrák is a hasznos gombapartner stressz-pufferoló szerepére utalnak, amit korábbi mikrokozmosz kísérletekben bioenergetikai mérésekkel mezőgazdasági talajban, vöröshere gazdanövényen is igazoltunk (BIRÓ et al. 2000, TSIMILLI-MICHAEL et al. 2000).

A kutatások az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA) által támogatott projektek keretében folytak. A műszereket az OM - MU-00199/2000 és az OTKA - M036959 sz. támogatásai biztosították.

BIRÓ IBOLYA, TAKÁCS TÜNDE

Különböző eredetű *Glomus mosseae* törzsek intraspecifikus variabilitásának vizsgálata infektivitásuk és effektivitásuk alapján

MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete, Budapest

A szárazföldi ökoszisztémákban általánosan elterjedt a gombák és növények mutualista szimbiózisa a mikorrhiza. A mikorrhiza gombák jelenléte jobb tápanyagellátást, nagyobb vízfelvételt és nagyobb fémtoleranciát biztosíthat gazdanövényük számára azok fémfelvételének csökkentése révén.

A kísérlet keretében az arbuskuláris mikorrhiza gombák (Arbuscular Mycorrhizal Fungi=AMF) csoportjába tartozó négy *Glomus mosseae* különböző eredetű törzseivel történt oltás hatásának összehasonlítását végeztük fehér here (*Trifolium repens* L.) gazdanövényen. A *G. mosseae*-BEG12 néven jegyzett törzs az európai törzsbankból (La Banque Européenne des Glomales) származik. A *G. mosseae*-S, *G. mosseae*-F és *G. mosseae*-Ö jelű gombatörzsek hazai talajokból történt spóraizolálások és felszaporítások eredményei. A *G. mosseae*-BEG12, *G. mosseae*-S és *G. mosseae*-Ö törzsek nehézfémekkel nem szennyezett talajokból származnak. A *G. mosseae*-F jelzésű AM-gomba törzset kadmiummal szennyezett talajokból izolált spórákból állították elő. A különböző eredetű oltóanyagokkal 5%-os oltást végeztünk.

A tenyészedénykísérletben előzetesen sterilizált nagyhorcsóki mészlepedékes csernozjom talajt (100 kg/ha év N, P, K) használtunk. A talaj kadmium terhelését a nehézfém szulfát-sójának oldatával (CdSO₄ 8/3 H₂O) három szinten (0, 50, 100 mg kg⁻¹), variánsoként három ismétlésben állítottuk be. Kontrollként sterilizált talajban nevelt, AM-gombával nem oltott növényeket használtunk. A fémszennyezés tükrében AM-gombák fertőzőképességének, azaz infektivitásának megállapítása céljából vizsgáltuk a különböző eredetű *G. mosseae* törzsek gombáinak gyökérkolonizációs mutatóit gazdanövényük gyökerében, valamint az AM-gombával oltott és nem oltott (kontroll) gazdanövények fémfelvételére, hajtás- és gyökérbiomassza termelésére és makroelemtartalmára (N, P, K) gyakorolt hatásukat, azaz effektivitásukat.

A különböző eredetű *Glomus mosseae* törzsekkel történő oltások közül legeredményesebbnek a *G. mosseae*-S, ill. a *G. mosseae*-Ő törzsek bizonyultak. Kolonizációjuk jelentősen megnövelte a gazdanövények biomassza termelését a kontroll, nem mikorrhizás növényekhez, ill. az egyéb *G. mosseae* törzsekkel kezelt növényekhez képest. Emellett kolonizációjuk kedvező hatása magasabb fémtartalom esetén is érvényesült, jelentősen csökkentették a gazdanövények fémtartalmát, ezáltal növelve azok fémtoleranciáját. A kadmiummal szennyezett talajból izolált, a szennyezéshez feltételezhetően adaptálódott *G. mosseae*-F jelű törzs gombáival történő fertőzés hatására a nem mikorrhizás növényekhez képest szintén (bár a fentiekhez képest kisebb mértékben) csökkent a gazdanövény hajtásában mérhető kadmium koncentráció. A mikorrhizált fehér here fémfelvételét (Cd) a fémszennyezéshez adaptált és nem adaptált AM-gombák jelenléte egyaránt csökkentette a nem mikorrhizáltakéhoz képest a nagyhorcsóki talajban. Kísérletben az irodalmi adatokkal ellentmondásban, a Cd-szennyezéshez adaptálódott AM-gombák infektivitási és effektivitási tulajdonságai rosszabbnak bizonyultak, mint a fémszennyezéshez nem adaptált *G. mosseae* törzsek AM-gombáié.

A jelen dolgozat alapjául szolgáló vizsgálatok az OTKA F042543 sz. pályázat keretén belül készültek.

BÍRÓ SÁNDOR¹, BIRKÓ ZSUZSA¹, KEITH CHATER²

A sejtdifferenciálódás szabályozásának funkcionális genomikai vizsgálata *Streptomyces*-ekben

¹DE OEC Humán-genetikai Intézet, Debrecen; ²John Innes Centre Department of Molecular Microbiology, Norwich, UK

A *Streptomyces* Gram pozitív, micéliális növekedésű talajbaktériumok. Fiziológiai és genetikai vizsgálatukat a differenciálódási modellnek tekintett, spóráképzéssel végződő életciklusuk, s antibiotikum termelésük egyaránt indokolják.

A génextpresszió szabályozásának vizsgálatában új fejezet kezdődött a genomialis szekvenciák (*Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces avermitilis*) meghatározásával, és az első DNS mikroarray (*S. coelicolor*) megjelenésével.

Kísérleteink célja a differenciálódás pleiotróp hatású extracelluláris autoregulátorának, az általunk leírt C faktor hatásának vizsgálatán keresztül, a *S. coelicolor* mikroarray használhatóságának vizsgálata volt más *Streptomyces* törzsek esetében.

Először *S. griseus* és *S. flavofungini* törzsek genom DNS-ének a *S. coelicolor* mikroarray-hez való hibridizálását vizsgáltuk, majd a biztató eredmények alapján a C faktor hatására be- vagy kikapcsolódó géneket próbáltuk azonosítani a *S. griseus* modellrendszerünkben.

Előadásunkban ezekről a kísérletekről számolunk be.

BORBÉLY ÁGNES ANIKÓ, MURVAI MELINDA, GERGELY LAJOS, VERESS GYÖRGY

A humán papillomavírus 16 (HPV 16) e6 és e7 onkogénjének hatása a survivin gén expressziójára

DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Debrecen

A survivin fehérje az apoptózis gátlása mellett a sejtosztódás szabályozásában is részt vesz. Fontos szerepet játszik a szövetek differenciálódásában és az embriogenezisben.

Normális esetben a felnőtt szövetekben a fehérje nem detektálható, de nagy mennyiségben expresszálódik a legkülönbözőbb daganatokban, így a méhnyakrák egyes stádiumaiban, különösen a progresszívebb formákban.

A cervix carcinoma kialakulásában lényeges szerepet tulajdonítanak a humán papillomavírusnak. A vírus onkoproteinjei (E6 és E7) beavatkoznak a sejtciklus működésébe, ezáltal a méhnyak malignus elváltozását indukálják.

Kísérleteinkben tranziens transzfekcióval vizsgáltuk különböző sejtvonalakon az E6 és E7 fehérjék survivin génre gyakorolt hatását. Az E6 aktiválta a survivin gén promóterét, szemben az E7-tel, mely nem adott szignifikáns eredményt. Ugyanezeket a kísérleteket különböző HPV 16 E6 mutánsokkal elvégezve azt tapasztaltuk, hogy a p53 tumorszuppresszor kötő képességét veszített E6 formák aktiváló hatása elmaradt a vad típusétól. Mivel az E6 a p53 ubiquitin-függő lebontását indukálja, lehetséges, hogy az E6 transzaktiváló hatása a survivinre részben a p53 degradációján keresztül valósul meg, tekintettel arra, hogy a p53 fehérje önmagában gátolta a survivin gén kifejeződését.

Humán embrionális fibroblasztot stabilan transzfektáltunk a HPV 16 E6 és E7 onkogénjeit hordozó retrovírus vektorokkal, majd Northern blot analízissel kimutattuk, hogy mindkét onkoprotein képes az endogén survivin mRNS szintjét növelni. FACS analízissel vizsgálva a sejtciklus különböző fázisaiban levő sejtek arányát azt találtuk, hogy az E7-t hordozó sejtekben a sejtek megoszlása a G2/M fázisban nagyobb a kontrollhoz képest, ami azért érdekes, mert a survivin szintje a sejtciklus ezen szakaszában a legmagasabb.

Eredményeink összegezve feltételezhetjük, hogy a survivin gén működését az E6 a promóter direkt transzaktiválásával, valamint a p53 fehérje degradációjával, az E7 pedig a sejtciklusra gyakorolt hatása révén befolyásolja.

BORSODI ANDREA, MAKK JUDIT, RUSZNYÁK ANNA, MOLNÁR PIROSKA, MÁRIALIGETI KÁROLY

A Velencei-tó és a Soroksári-Duna nádasainak felszíneiről kitenyészített *Bacillus* törzsek összehasonlító feno- és genotípusos vizsgálata

ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszék, Budapest

A magyarországi vizes élőhelyeken (tavak litorális zónájában, folyók partszegélyén) domináns állományokat képező nádasok, illetve a víz alatti felületükön kialakuló élőbevonatok elsősorban szűrőfunkciójuk révén fontos szerepet játszanak a vizek öntisztulásában. E folyamatok hatékonyságát, a szervesanyagok átalakítását a biofilmeket alkotó mikrobaközösségek aktivitása és faji összetétele határozza meg. A kedvezőtlen környezeti körülmények között endospórát képező *Bacillus* fajok széles körben elterjedtek és gyakran a kitenyészthető mikrobapopulációk domináns frakcióját képezik. A többségében szaprotróf *Bacillus* fajok általános előfordulását elősegíthetik azon képességeik, hogy számos biopolimer bontására képes extracelluláris enzimeket, antibiotikumokat, vagy növényi növekedést serkentő anyagokat szintetizálni és a környezeti feltételek (hőmérséklet, pH) széles skáláját képesek tolerálni. A Velencei-tó három mintavételi pontjáról és Soroksári-Dunaágból a vízfelszíntől kb. 20 cm-es mélységből nádszár mintákat gyűjtöttünk. A nádfelszíni kaparékból szélesztéssel különböző összetételű táptalajok felhasználásával 54 *Bacillus* törzset nyertünk, melyeket hagyományos morfológiai és biokémiai-fiziológiai vizsgálatok, valamint az API 50CHB eredményei alapján numerikus analízissel csoportosítottuk. A kiválasztott reprezentatív törzsek 16S rDNS-ének parciális szekvencia analízisével végzett identifikáció *Brevibacillus agri*, *Bacillus cereus*, *B. firmus*, *B. flexus*, *B. horikoshii*, *B. macroides*, *B. marinus*, *B. pumilus* és *B. subtilis* fajokat eredményezett.

BORSODI ANDREA, SZABÓ GITTA, VLADÁR PÉTER, RUSZNYÁK ANNA, SIPOS RITA, MÁRIALIGETI KÁROLY

A Kiskunsági Nemzeti Park szikes tavai baktériumközösségeinek tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független molekuláris biológiai vizsgálata

ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszék, Budapest

A Kiskunsági Nemzeti park területén fekvő „székek” tipikus alkalikus, sósvízű, időszakosan kiszáradó, rendkívül sekély szikes tavak. E tavak közül bakteriológiai vizsgálatok céljából 2002 és 2003 tavaszán és őszén gyűjtöttünk üledékmintákat a Kelemen-szék, a Zab-szék és a Böddi-szék területéről. Több mint 180 kitenyészített baktériumtörzs részletes fenotípusos (morfológiai, fiziológiai-biokémiai és ökológiai

tolerancia) vizsgálatát végeztük el. A biopolimerek bontásától eltekintve a baktériumtörzsek legnagyobb része nagyfokú inaktivitást mutatott a hagyományos tesztekben. A pH tolerancia tesztek eredményei alapján a törzsek több mint 90%-a intenzíven növekedett pH 10,0 értéken, vagyis fakultatív illetve obligát alkalofil sajátságot mutatott. A NaCl tolerancia eredmények alapján a törzsek 5-7% NaCl (w/v) koncentrációknál növekedtek optimálisan, és csak kevesebb, mint 30%-uk volt képes szaporodni NaCl nélkül. A fenotípusosan megegyező tulajdonságokat mutató törzsek közül kiválasztott reprezentatívok 16S rDNS szekvencia analízisével a legtöbb törzset a kis G+C tartalmú Gram-pozitívok (*Bacillus halmapalus*, *B. niacini*, *B. pseudofirmus*, *B. alcalophilus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. cereus* és *Marinibacillus marinus*) fajaként határoztuk meg. A többi törzset a gamma-proteobaktériumok (*Halomonas desiderata* és *Pseudomonas anguilliseptica*) és a nagy G+C tartalmú Gram-pozitívok (*Nesterenkonia halobia*, *Micrococcus luteus* és *Agromyces aurantiacus*) fajaként azonosítottuk. Sem a tenyésztésen alapuló, sem pedig a tenyésztéstől független DGGE vizsgálatok eredményeként nem lehetett a baktériumközösségek összetételében szezonális különbségeket felfedezni, ami arra utal, hogy e szikes tavak feltehetően a speciális környezeti feltételekhez adaptálódott stabil mikroba populációkkal jellemezhetők, melyekben a szezonális változások sokkal inkább a közösségek aktivitását semmint az összetételét befolyásolják.

BUJNA ERIKA, SZAPPANOS JUDIT, REZESSYÉ SZABÓ JUDIT M., NGUYEN DUC QUANG, HOSCHKE ÁGOSTON

Fonals gomba fitáz enzim termelése és tisztítása

BCE Sőr- és Szeszipari Tanszék, Budapest

A fitáz enzim (mioinozit-hexafoszfát-foszfohidroláz) a természetben széles körben előforduló foszfatáz. Az enzim a fitinsav hidrolízisét katalizálja, mely során foszfátészterek hasítása közben foszfát szabadul fel, mely az emberi és állati szervezetek növekedéséhez, csontosodásához szükséges vegyület. A fitátok antinutritív faktorok, mivel a szervezet számára szükséges makro- és mikroelemekkel (Ca, Fe, Mg, Zn) oldhatatlan komplexet képezve megakadályozzák azok felszívódását. Ezért a fitáz enzimet táplálék kiegészítőként alkalmazva az megnöveli ezen vegyületek hozzáférhetőségét (azoknál a szervezeteknél, melyeknél ez az enzim nem áll rendelkezésre, pl. egygyomrúak: sertés, ember). Az intenzív használat tenyésztés következményeként a természetben a szerves foszfát felhalmozódás jelentős mértékű. Ennek a környezetvédelmi problémának csökkentése is eredményesen megoldható a fitázzal történő enzimes kezeléssel.

Jelen munkánk során célul tűztük ki a *Thermomyces lanuginosus* termofil gomba különböző törzseinek szelektálását fitáz enzim termelésére, valamint a tápközeg és inokulum összetételének a fitáz enzimtermelésre gyakorolt hatásának tanulmányozását. Céljaink között szerepelt a *Thermomyces lanuginosus* eredetű fitáz enzim tisztítása és jellemzése.

Nyolc törzset rizslisztes tápközegen tenyésztve azt tapasztaltuk, hogy a CBS 288.54 és az ATCC 34626 jelzésű törzsek mutatták a legjobb fitáz aktivitásokat. Ezen törzsek nagyobb mint 6 E/L enzimtiteret értek el. Kísérlettervezési stratégiát alkalmazva megvizsgáltuk különböző inokulum mennyiségek, glükóz és rizsliszt koncentrációk hatását az enzimtermelésre. Megállapítottuk, hogy a fitáz aktivitás 10 tf% inokulum alkalmazásával 0,5 % glükózt és 5 % rizslisztet tartalmazó tápközegen több mint 12 E/L aktivitást mutatott, amely kétszeres aktivitás növekedést jelent. Az inokulum kora a vizsgált tartományban nem gyakorolt szignifikáns hatást az enzimtermelésre. Az inokulum tápközegben lévő szerves foszfát mennyiség optimalizálásával - a foszfát koncentráció jelentős csökkentésével - 0,075 % KH_2PO_4 és 0,05 % K_2HPO_4 koncentrációnál értük el a legjobb eredményeket.

A megtermelt extracelluláris fitáz enzimet ammónium-szulfátos frakcionált kicsapással nyertük ki és kromatográfiás (Q-Sepharose, Phenyl-Sepharose és Superose 12) módszerekkel tisztítottuk. A tisztított enzim denaturált poliakrilamid gélen 2 fehérjespeciést (60 kDa és 90 kDa), de az izoelektromos fókuszálásnál csak 1 speciést (pI 4,0-4,2) mutatott. Ez arra utal, hogy a vizsgált fitáz enzim több azonos izoelektromos pontú, de különböző molekulatömegű egységből áll. Az enzimnek pontos fiziko-kémiai jellemzése további vizsgálatokat igényel. A *Thermomyces lanuginosus* eredetű fitáz enzim sikeresen alkalmazható a mezőgazdaságban környezeti problémák kezelésére a szerves foszfát csökkentésére.

A kutatások az OTKA támogatásával a T-042653 számú kutatási témájának keretein belül készültek.

A szerzők köszönetet mondanak Professzor Marc Claeysnek az általa vezetett laboratóriumban történő kutatási

munka végzésének lehetőségéért.

CEKOVSKA ZAKLINA¹, N. PANOVSZKY¹, M. PETROVSZKA¹, GHIDÁN ÁGOSTON², ROZGONYI FERENC²

Some characteristics of Macedonian methicillin resistant *S. aureus*

¹Univerzitet Skopje Medicinski Fakultet Institut za Mikrobiologija Parazitologija, Skopje, Macedonia;

²Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Budapest

A total number of 60 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated mainly from the patients of the Intensive Care Unit and the Department of Surgery, Medical Centre, Skopje, was examined for resistance to amoxicillin+clavulanic acid, macrolides, tetracyclines, chloramphenicol, aminoglycosides, fluoroquinolones and glycopeptides by the disc diffusion method according to the guidelines of NCCLS. Methicillin-resistance was determined with the oxacillin disc diffusion method, agar plate screening and broth micro-dilution test. The presence of *mecA*-gene was shown by a multiplex PCR method. MICs of oxacillin and vancomycin for the strains were determined by the broth dilution method, too. Out of the 60 strains 49 (82%) harboured the *mecA*-gene and needed an MIC of higher than 256 mg/L of oxacillin. Fourteen out of these *mecA*-positive strains were sensitive to only vancomycin and teicoplanin, furthermore another 14 strains were susceptible to three antimicrobials and 15 to four or more. Eight out of the *mecA*-negative strains showed sensitivity to four or more groups of anti-staphylococcal agents other than oxacillin. Three strains of *mecA*-positive from patients of the Intensive Care Unit needed 8 mg/L vancomycin to inhibit growth but none of them harboured the *vanA*-gene.

CZEGLÉDI ALÍZ, KOVÁCS M. GÁBOR, LOMNICZI BÉLA

Baromfipestis vírus (NDV) genotípusok filogenetikája

MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet, Budapest

A baromfipestist (Newcastle-betegséget) a paramyxovírusok családjába tartozó avian paramyxovírus-1 egyetlen tagja, a Newcastle disease virus (NDV) okozza. A vírus genomját több mint 15 000 nukleotid (nt) alkotja, és 6 génje van. A betegség a harmadik világ országaiban endémiás fertőzés formájában fordul elő, de az intenzíven védekező országokban is időről-időre súlyos epidémiák lépnek fel. Az elmúlt 70 évben gyűjtött vírusokat eddig összesen nyolc genotípusba soroltuk, amelyek valamelyik földrajzi területre és/vagy járványvonulatra jellemzőek. Ez a csoportosítás, amelyet a nemzetközi irodalom elfogadott, azonban csak a virion egyik nyúlványát alkotó, az un. fúziós (F) fehérje génjének részleges (400 nt-nyi) szekvenciáján alapul. Emiatt felmerül a kérdés, hogy a genom mindössze 2.5%-át kitevő szakasz reprezentálja-e az egészet, és hűen tükrözi-e a törzsek közti rokonsági viszonyokat. Különösen aktuális a kérdés, hogy nem régen törzsek közötti rekombinációt is leírtak. A felvetések vizsgálatára a többi 5 gént — nukleoprotein (NP), foszfoprotein (P), mátrix protein (M), haemagglutinin-neuraminidáz (HN) és polimeráz protein (L) — is filogenetikai vizsgálatnak vetettük alá. 60 reprezentatív vírustörzs összehasonlító elemzése során az alábbi megállapításokat tettük: 1. A különböző gének fái kongruensek voltak: az NP, P, M, HN és L gének részleges filogenetikai analízise ugyanazokat a rokonsági viszonyokat rekonstruálta, mint amelyeket az F gén vizsgálatával korábban már feltártunk. 2. Rekombinációra utaló jeleket nem találtunk. 3. A belső lokalizációjú foszfoproteint kódoló P-gén variabilitása és evolúciós rátája, a vizsgált szakaszon, meglepetésre elérte a felszíni nyúlványfehérjéket kódoló F- vagy HN-génét. 4. A nukleoprotein 5'-végi nem kódoló szakaszán található 6 nukleotidból álló beékelődés alapján a genotípusok régi- (I-IV) és újakra (V-VIII) oszthatók. Ez a szerzett közös jegy az újabb genotípusok közös eredetére utal.

CZEGLÉDI ALÍZ¹, UJVÁRI DORINA¹, PÉNZES ZOLTÁN², PALYA VILMOS², LOMNICZI BÉLA¹
Kísérletek a baromfipestis vírus (NDV) genetikai módosítására. I. Minigenom rendszer kidolgozása

¹MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet; ²CEVA-Phylaxia Oltóanyagtermelő Rt., Budapest

A baromfipestis (Newcastle-betegség) a tyúkfélék legveszélyesebb járványos betegsége. Bár 50 éve

hatékony és olcsó tömegvakcinázás áll rendelkezésre, a betegség világszerte terjed. Valószínűleg azért, mert az immunitást részben áttörő újabb törzsek bukkantak fel. Ezeket az V. – VIII. genotípusokban találjuk, míg az ellenük használt élő, attenuált vakcinatörzsek az un. régi (I. – II.) genotípusokba tartoznak. Hipotézisünk szerint egy homológ vakcinatörzs jobban védene az újabb járványtörzsek ellen. Ennek vizsgálatára célul tűztük ki, hogy egy régi (I. csoportbeli) vakcinatörzs genomjában a protektív fehérjék génjeit (fúziós, F-et és hemagglutinin-neuraminidáz, HN-t) kicseréljük egy recens vírustörzs megfelelő génjeire. Mivel ilyen léptékű vagy egyéb célzott változtatást csak DNS-en lehet elvégezni, az NDV genomja pedig negatív polaritású és egyszálú RNS, a módosított vírust a replikációs komplex génjeit hordozó expressziós vektorokból kell rekonstruálni. Az elmúlt években az ide vezető lépésekről számoltunk be, nevezetesen, hogy egy vakcinavírus teljes genom cDNS-t, valamint a nukleoproteint (NP), a foszoproteint (P) és a nagy (Large, L) polipeptidet kódoló géneket T7-fág transzkripció szabályozása alatt álló expressziós vektorokba klónoztuk. Most egy olyan NDV-specifikus minigenomot mutatunk be, ahol a vektorba épített genom cDNS közel 98%-át kivágtuk, és helyére CAT (klóramfenikol acetil transzferáz) jelzőgént építettünk. Amikor ezt a minigenomot az NP, a P és az L géneket hordozó replikációs segéd-vektorokkal együtt transzfektáltuk csirkeembrió vesesejtekbe, CAT-fehérje képződött, amit ELISA-val mutattunk ki. Mivel a CAT termeléséhez a 4 vektor együttes expressziója szükséges, arra következtettünk, hogy a vírus-rekonstrukciónak használandó segéd-vektorok működőképesek, csakúgy, mint genom cDNS molekulavégi szabályozó szakaszai, a vesesejtek transzfekciójára használt eljárás (elektroporálás) pedig megfelelő. A transzkripciót olyan baromfihimlő vírus fertőzésével biztosítottuk, amibe T7-fág RNS polimeráz génje van építve. Mindezekből az is következik, hogy nemcsak a T7-regulátorok működnek, hanem a minigenom NDV-specifikus is. A minigenom nemcsak egyes gének funkciójának vizsgálatára alkalmas, de egyszerű eljárás replikációs vektorok és a transzfekciós eljárás tesztelésére is. A kutatást az NKFP 4/040/2001 pályázat támogatta.

CZÖVEK PÁLMA, KIRÁLY ISTVÁN

Sztyeppei kucsmagomba (*Morchella steppicola* Zer.) szárazságstressz-toleranciájának élettani vizsgálata

ELTE TTK Növényélettani Tanszék, Budapest

Az evolúciós tekintetben fiatal *Morchella* nemzetségbe tartozó sporadikus elterjedésű sztyeppei kucsmagomba (*Morchella steppicola* Zer.), élettani szempontból igen érdekes. A kucsmagombák elterjedésére általánosan jellemző, hogy meszes talajú üde élőhelyeken, tölgy és kőris alkotta liget- és lomberdőkben fordulnak elő. A *Morchella* nemzetség fajai között a sztyeppei kucsmagomba az átlagtól eltérő környezeti igényű – kifejezetten száraz, kitett élőhelyeken, meszes-dolomitos talajok lágyszárú társulásaiban fordul elő. Vizsgálataink középpontjában a száraz élőhelyekhez való adaptációja hátterében meghúzódó élettani sajátosságai álltak. A tenyészeteket polietilén-glikol (PEG) tartalmukban különböző szilárd táptalajon neveltük. A kucsmagomba fajok nedvességigényének figyelembevételével átlagban a 12 és 15% PEG (m/m%) képviseli a közepes erősségű-, míg a 18 és 21% PEG a fokozott mértékű szárazságstresszt. A micélium lipid-peroxidáció során keletkező malondialdehid (MDA) tartalom-, és a különféle –reaktív oxigénformák keletkezésével járó– stresszhatások elleni védekezésben jelentős szerepet betöltő szuperoxid-dizmutáz izoenzimek (SOD) aktivitás változásának követése szolgáltat információt a szárazságstressz fennállásáról és mértékéről. A MDA tartalom változásának követésére spektrofotometriás módszert alkalmaztunk. A SOD aktivitás mérését és az izoformák elkülönítését PAGE-sel és denzitometriás értékelő szoftverrel végeztük el. A micélium szénhidrát-profiljának kvalitatív analizéséhez nagyteljesítményű rétegekromatográfiát (HPTLC), kvantitatív analizéséhez denzitometriás értékelő szoftvert használtunk. A szárazságstressz mértékével párhuzamosan növekedett a micélium MDA tartalma, fokozódott a SOD aktivitás, a SOD izoenzimek össz-aktivitásában a kisebb molekulaméretű.

CSÁGOLA ATTILA¹, KECSKEMÉTI SÁNDOR², KISS ISTVÁN², TUBOLY TAMÁS¹

Sertés circovírusok előfordulása a hazai vadon élő sertés-állományokban

¹SZIE ÁOTK Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék, Budapest; ²Debreceni Állategészségügyi Intézet, Debrecen

Munkánk során vizsgáltuk Magyarországon élő vaddisznókban (*Sus scrofa*) a sertés circovírusok (porcine circovirus, PCV) előfordulási gyakoriságát polimeráz láncreakció (PCR) módszerrel. Meghatároztuk, hogy a kimutatható PCV genomok, melyik genotípusba tartoznak (PCV1 vagy PCV2), és elvégeztük a PCV2 csoportba soroltak nukleinsav-szekvencia szintű összehasonlítását.

A vaddisznóból származó mintákat a 2001 és 2004 közti időszakban gyűjtöttük, egy részük egy vadfeldolgozó üzemtől származott, de többségében a Debreceni Állategészségügyi Intézet vizsgálati anyagaira támaszkodtunk. A mintákat először a származási terület és a gyűjtési időpont alapján csoportosítottuk. Egy-egy területről és időből származó minták közül annyit vizsgáltunk PCR módszerrel, amíg legalább 1 PCV-pozitív nem találtunk. A PCR termékeket szekvenáltattuk, és ez alapján a mintákat újracsoportosítottuk. Ezt követően a különböző csoportokból egy-egy vírus teljes genomját megszekvenáltattuk.

A részleges és teljes szekvenciák alapján vizsgáltuk, hogy az ország adott területein, mely vírus típusok fordulnak elő. Az eddigi eredmények alapján a hazai vaddisznókban előforduló sertés circovírusokat 4 csoportba tudtuk sorolni. Az egyes csoportokba tartozó vírusok házi sertésekben detektált PCV genomokkal mutatott rokonsági fokait filogenetikai módszerekkel vizsgáltuk.

NKFP4/40/2001

CSIRE MÁRTA¹, ERDÉLYI KÁROLY², FÜLE TIBOR³, EGYED LÁSZLÓ⁴, MEZEY ILONA¹ ÉS BERENCSI GYÖRGY¹

Herpeszvírusok kimutatása állatkerti majmokban

Johan Béla OEK ¹Viroológiai Főosztály; ²Országos Állategészségügyi Intézet, Vadegészségügyi Osztály; ³MTA Molekuláris Patológiai Kutatócsoport, Semmelweis Egyetem; ⁴MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete, Budapest

Emberi herpeszvírus (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV, HHV-6, HHV-8) fertőzések jelenlétét vizsgáltuk, hét állatkertben tartott, különböző betegségben szenvedő főemlős faj egyedeiben (mókusmajom, Goeldi-féle selyemmajom, törpemajom, huszármajom, mandrill, lisztmajom, makákó). Az állatok magyarországi állatkertekben hullottak el, különösebb specifikus klinikai tünetek megjelenése nélkül. Nested –PCR módszerrel human herpeszvírus 8 DNS (HHV-8, Kaposi sarcoma asszociált herpeszvírus) volt kimutatható öt fajtól beleértve a három újvilági főemlős fajt is, a PCR termék szekvenálásával és *in situ* DNS hibridizációval megerősítve. Két HHV-8 DNS pozitív újvilági majomfajban intersticiális tüdőgyulladást, a májban, tüdőben, vesékben és a lépben elhalásos góccokat találtunk. Human herpeszvírus 4 (HHV-4, Epstein-Barr vírus) DNS jelenlétét mutattuk ki öt fajtban és a human herpeszvírus 5 DNS-t (HHV-5, Human cytomegalovírus) a Goeldi-féle selyemmajomban, mókusmajomban és a makákóban. Az összes vizsgált állat mentes volt a human herpeszvírus 3 (Varicella zoster vírus) és human herpeszvírus 6 DNS-től. A Kaposi sarcoma asszociált herpeszvírus fehérjéit nem mutattuk ki, de jelöltük a HHV-8 PCR termékeket és kimutattuk a vírus DNS jelenlétét a nyirokcsomókból, májból és az artériák falából készült szövettani metszetekben *in situ* DNS hibridizáció segítségével. A vizsgált fajok között több védett, a kihalás szélén álló fajt is találunk. A körükben fellépő emberi herpeszvírus fertőzések ezért nem csak a gondozó személyzet számára jelentenek kockázatot, hanem a fajvédelmi programok sikerét is komolyan veszélyeztetik. Ez az első beszámoló újvilági majomfajok HHV-8 fertőzéséről

CSOMA ESZTER, NAGY ETELKA, BECK ZOLTÁN, KÓNYA JÓZSEF

A humán herpeszvírus 6 (HHV-6) és a humán immundeficiencia vírus (HIV) kölcsönhatásának vizsgálata mononuclearis phagocytákban

DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Debrecen

A humán herpeszvírusok és a HIV közötti kölcsönhatásnak fontos szerepe van a HIV-fertőzéshez társuló opportunisták patogenezisében és az alapbetegség lefolyásában. A HHV-6 rendkívül elterjedt a populációban, a szeropozitivitás aránya meghaladja a 90 %-ot. A vírusnak A és B variánsa ismert. A HHV-6A ritkán mutatható ki immunológiailag intakt személyekben, főleg immunszuppresszált betegekben izolálható. A HHV-6 és a HIV kölcsönhatását már több sejt esetében vizsgálták. Ezekben a tenyészetekben a HIV nem stimulálta a HHV-6 szaporodását. A HHV-6 HIV-re gyakorolt hatása nem ilyen egyértelmű: fokozhatja, de gátolhatja is a replikációt. A két vírus kölcsönhatását a HHV6 látencia fő célsejtjeiben, a mononuclearis phagocytákban kívánjuk vizsgálni.

Kísérleteink során perifériás vérből szeparálunk monocytá sejtet, illetve azokból macrophag kultúrákat hozunk létre. A differenciálódott macrophagokat a HHV-6A GS, illetve a HIV-1 Ada-M törzsével fertőzzük, külön-külön, illetve együttesen, majd vizsgáljuk a kultúrák vírustermelését.

Eddigi eredményeink alapján a kettősen fertőzött sejtekben a HIV szaporodása jelentősen gátolt a csak HIV-vel fertőzött tenyészetekhez képest. A gátló hatás a 14. napig érvényesül, majd ezt követően fokozódik a koinfekciós kultúrák HIV-termelése. Ebben valószínűleg a HHV-6 fertőzés hatására termelődött citokineknek lehet szerepe. A HHV-6-tal fertőzött tenyészetek felülcsúszójában jelentős mennyiségű interleukin-10 (IL-10) termelést lehet kimutatni. E citokinnal korábbi tanulmányok már bizonyították, hogy képes a HIV replikációját gátolni. Ebben szerepet játszik a HIV szaporodását stimuláló citokinek termelésének befolyásolása. A továbbiakban tervezzük a HHV-6 HIV-replikációt gátló hatásának, illetve az IL-10 szerepének tisztázását.

Továbbá vizsgáljuk a sejt kultúrák HHV-6 termelését. Kíváncsiak vagyunk, vajon a HIV befolyásolja-e a HHV-6 replikációját, és amennyiben igen, milyen módon.

CSORBA RENÁTA¹, KISS FERENCNÉ², JÓJÁRT EDIT¹

Cucurbitaceae családba tartozó vad- és termesztett növényfajok cukkini sárga mozaik vírus (ZYMV) fogékonyságának vizsgálata

¹SZTE Mezőgazdasági Főiskolai Kar Növénytermesztési és Kertészeti Tanszék, Hódmezővásárhely

A cukkini sárga mozaik vírus (ZYMV) hazai első megjelenését követően -1995 óta- a *Cucurbitaceae* család egyik legveszélyesebb vírusává vált, mely súlyos járványokkal fenyegeti a kabakos kultúrákat. Vizsgálataink során célul tűztük ki a vírus elleni védekezés szempontjából nélkülözhetetlen gazdanövénykör kutatást vad és termesztett kabakos fajokon, melyeknek - különösen a feltételezett áttelelő gazdáknak - nagy szerepük lehet a vírus fennmaradásában. Kísérleteinket a *Cucurbitaceae* család 8 nemzetségéből (*Cucumis*, *Cucurbita*, *Cyclanthera*, *Ecballium*, *Momordica*, *Lagenaria*, *Zehneria*, *Bryonia*) összesen 17 vad és termesztett faj egyedeivel végeztük. A tesztnövényeinket mesterségesen fertőztük ZYMV-10 izolátummal, mechanikai átvitelrel karborundum abrazívum felhasználásával. A fertőzést követően vizuálisan értékeltük a lokális és szisztemikus tüneteket. A vírusok pontos kimutatását DAS-ELISA szerológiai teszttel végeztük. A mért víruskoncentráció alapján a tesztnövényeket fogékony és ellenálló kategóriákba soroltuk.

Fogékonysági vizsgálataink során megállapítható, hogy a *Cucumis* és a *Cucurbita* nemzetség vizsgált vad és termesztett fajtái mind gazdanövényei a vírusnak. A vad fajok - termesztett kultúrnövényeinktől eltérően - a vírussal szemben lényegesen ellenállóbbnak bizonyultak. A kísérletünkben feltárt új gazdanövények jelen ismereteink alapján a *Bryonia dioica*, *Cyclanthera pedata*, *Ecballium elaterium*, *Momordica balsamina*, *Momordica rostrata*, és a *Zehneria scabra*. Közülük látenciát tapasztaltunk az *Ecballium elaterium* és a *Momordica balsamina* fajok esetében. Az *Ecballium elaterium* és *Bryonia dioica* növényfajok, mint Magyarországon honos évelő gyomnövények termesztett kabakos kultúráink közelében virusrezervoárok és egyúttal fertőzési források lehetnek. Annak ellenére, hogy a vírus hazai áttelelő gazdanövényeiről bővebb ismereteink még nincsenek e két fajon kívül, és elsősorban a magátvitel és vektorátvitel szerepe bizonyított, a járványok évről-évre történő kialakulása szükségessé teszi az áttelelő gazdanövények további kutatását is. Tekintettel az uborka és egyéb tökfélék kezdeti fejlődése során tapasztalt csekély gyomelnyomó képességre, feltétlenül indokolt a kórokozók gazdakörének ismeretében a káros növényzsomszédok elkerülése és a vírusvektor levéltetvek elleni rendszeres védekezés. Különösen figyelemre méltóak a *Bryonia alba* és a *Zehneria indica* növények, melyek vizuálisan és szerológiai vizsgálatokkal egyaránt vírusmentesnek bizonyultak, és ezen eredményeknek jelentős szerepük lehet a vírus differenciálás és a rezisztencia nemesítés terén.

CSUKÁS ZSUZSANNA¹, TÖRŐ KLÁRA², MÉSZÁROS RITA², MÉSZÁROS ÁRPÁD³

***Haemophilus influenzae* b védőoltás és a hirtelen csecsemőhalál szindróma Magyarországon**

¹Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézet; ²Igazságügyi Orvostani Intézet; ³Központi Statisztikai Hivatal, Budapest

A csecsemőhalálozás gyakoribb Magyarországon, mint az EU tagállamokban. A Hirtelen Csecsemő Halál Szindróma (SIDS) előfordulása viszont hazánkban kedvezőbb, mint Nyugat Európában és az Egyesült Államokban. A csecsemőkori kötelező védőoltások a SIDS megelőzésében is jótékony hatásúak. Nagy Britanniában a DiPerTe védőoltás előrehozása két hónapos korra, a SIDS előfordulását redukálta e korcsoportban. Magyarországon 1999-ben vezették be a két hónapos csecsemők *Haemophilus influenzae* B (HiB) védőoltását. A csecsemőhalálozás és a SIDS esetszámát elemezték 1990-2002 közötti években. A HiB védőoltás bevezetését követően csökkent a meningitisek száma 3,5 %-ról (1990-1998) 1 %-ra (1999-2003). Szignifikáns csökkenés alakult ki a SIDS halálozásban, a 2 hónaposnál idősebb csecsemők körében a HiB védőoltás 1999 évi bevezetése után, amikor is az esetszám 48 %-ról 39 %-ra csökkent (p=0,03). A SIDS esetszám csökkenését részben magyarázhatja a nem diagnosztizált HiB infekciók megelőzése, ill. antitestek keletkezése a HiB polysaccharidával conjugált tetanus toxoid hatására. A tetanus antitoxin keresztreakciót ad a SIDS pathogenezisében szerepet játszó bakteriális toxinokkal szemben.

DANKA JÓZSEF, KUCSERA ISTVÁN, OROSZ ERIKA, HORVÁTH KATALIN N., SZÉNÁSI ZSUZSANNA

A *Toxocara*-specifikus IgG ELISA érzékenysége és specificitásának vizsgálata a Western blot módszerhez képest

Johan Béla OEK Parazitológiai Osztály, Budapest

Az emberi toxocarosis a különböző *Toxocara* fajok L3-as stádiumú lárvái okozzák. Mivel a fertőzésnek nincsenek specifikus klinikai tünetei, a diagnózis általában a *Toxocara* elleni IgG vagy IgG+IgM izotípusú antitestek kimutatásán alapszik. A leggyakrabban alkalmazott módszer az ELISA, majd ezt követi a Western blot (WB). Mindkét módszer az *in vitro* tenyésztett *T. canis* lárvák exkretoros-szekretoros (ES) antigénjeit használja. A különböző gyártóktól származó kereskedelmi forgalomban lévő ELISA-k nemcsak a kivitelezés technikai részleteiben különböznek, hanem gyakran az általuk kapott eredmények sem egybevághók. Jelen munkánkban egy kereskedelmi forgalomban lévő IgG ELISA eredményeit értékeltük egy szintén kereskedelmi forgalomban lévő, kiváló szenzitivitású és specificitású WB kit eredményeinek tükrében.

A bevezető kísérletsorozatban, a toxocarosis gyanúja miatt Osztályunkra beküldött minták közül, a *Toxocara canis* IgG ELISA (EIA *Toxocara canis* IgG, Test-Line, Csehország) eredményei alapján 147 szérummintát választottunk ki úgy, hogy a negatívól az erősen pozitívig a teljes skálát lefedjük (66 negatív, 16 határérték és 65 pozitív). Valamennyi mintát megvizsgáltuk a WB módszerrel is (*Toxocara* Western Blot IgG, LDBIO, Franciaország). Az ELISA kit érzékenységét és specificitását a WB módszerrel kapott eredmények alapján számítottuk ki. Ezt követően még további 156 minta (136 ELISA negatív, 17 határérték és 3 alacsony pozitív) célzott WB vizsgálatára került sor. Ezeket a szérumokat asztmatikus vagy szemkárosodásra utaló tüneteket mutató fiatal betegek mintái közül válogattuk ki.

A bevezető vizsgálataink alapján a Test-Line ELISA érzékenysége 51%, míg a specificitása 100% volt a WB eredményekhez viszonyítva. Az ezt követő célzott vizsgálatokban az asztmatikus vagy szemtüneteket mutató 136 ELISA negatív beteg közül 101-nél tudtunk megfigyelni *Toxocara*-specifikus sávokat a WB módszerrel. A 17 határérték és 3 alacsony pozitív ELISA eredményű minta közül, 1 kivételével mind *Toxocara*-ra jellemző sávmintázatot mutatott. Az ELISA negatív minták esetében pozitív korreláció volt megfigyelhető a minták OD/cut-off indexe és a WB pozitív minták részaránya között.

Az ELISA negatív, de WB pozitív betegek magas aránya azt jelzi, hogy az alacsony ellenanyagszintek viszonylag gyakran fordulnak elő klinikai anyagban. Ezek az adatok arra hívják fel a figyelmet, hogy bizonyos esetekben, pl. asztmatikus vagy szemtüneteket mutató gyermekek esetében szükség van a negatív vagy határérték ELISA eredmények WB módszerrel történő konfirmálására.

Human toxocarosis is caused by the larval stage of different *Toxocara* species. Due to the lack of specific clinical signs, the diagnosis is usually based on the detection of anti-toxocaral IgG or IgG+IgM antibodies by indirect ELISA or by Western blot (WB) methods. All these tests utilize the excretory-secretory (ES) antigens obtained from *in vitro* maintained *T. canis* larvae. The commercial ELISAs of different manufacturers vary in their procedural parameters and in their performance characteristics, which can cause difficulties in the comparison and interpretation of the results. The objective of our investigations was the critical evaluation of the outcome of an commercial IgG ELISA comparing with an commercial IgG Western blot test which offers high sensitivity and specificity.

In the preliminary study 147 serum samples of patients with clinically suspected *Toxocara* infection were selected on the basis of the results obtained by the *Toxocara canis* IgG ELISA (EIA *Toxocara canis* IgG, Test-Line, Czech Republic). The whole range of indices of positivity (IP) values was covered by these sera (66 negative, 16 borderline and 65 from weak to strongly positive samples). All sera were tested by a WB method (*Toxocara* Western Blot IgG, LDBIO, France), too. The sensitivity and specificity of the ELISA test were computed in relation to the WB results. Furthermore, 136 ELISA negative, 17 borderline and 3 low positive samples from young patients with asthmatic manifestations or ocular disorders were also examined by WB method.

In the preliminary experiment the sensitivity of the Test-Line ELISA was found to be 51%, while the specificity was 100% in relation to the WB results. Furthermore, 101 of the 136 ELISA negative samples from patients with asthmatic manifestations or ocular disorders showed *Toxocara*-specific WB patterns with more or less intensively stained bands. Sixteen of the 17 samples with borderline ELISA value and the 3 samples with low positive ELISA result proved to be WB positive. Among ELISA negative samples, a positive correlation was observed between the sample OD/cut-off ratio values of the ELISA and the proportion of WB positive results.

The high proportion of WB positive patients with negative ELISA results suggests that low level antibodies can frequently occur in clinical samples. These data underline the necessity of the confirmation of the negative and borderline ELISA results by WB especially in children with asthmatic manifestations or ocular disorders.

DAVISON, ANDREW J.

Herpesviruses - genomics, phylogeny and evolution

MRC Virology Unit Institute of Virology, Glasgow, UK

A herpeszvírusok ikozaédes szimmetriájú nukleokapsziddal rendelkező, burkos vírusok, amelyek a sejtmagban replikálódnak, és gazdájukban életre szóló, látens fertőzést képesek előidézni. Ezek a kórokozók a gerinces állatfajok széles spektrumában, az embert is beleértve, megtalálhatók, de előfordulnak kagylókban is. Többségük igen jól alkalmazkodott a gazdához, és szigorúan gazdaspecifikus. Lineáris, duplaszálú DNS genomjuk mérete 125-240 ezer bázispár között mozog, és hozzávetőlegesen 70-170 gént tartalmaz. Teljes genom-szekvencia már több mint 30 fajból rendelkezésre áll, így a herpeszvírusok genomikájának és filogenetikájának megértése meglehetősen előrehaladott, de folyamatosan fejlődő állapotban van. Ugyanúgy mint más organizmusok esetében, a génösszetétel leírására irányuló elemzések eredménye az alkalmazott kritériumoktól függ. Az összehasonlító genomika alapvető jelentőségének bizonyult, amit a mintázat keresésen alapuló bioinformatikai megközelítés, az expressziós kísérletek eredményei, valamint a fenotípusra vonatkozó adatok jól kiegészítenek. A vizsgálatokból levont következtetések megbízhatóságát a szigorú virológiai megközelítésben végzett alapos elemző munka biztosítja. Filogenetikai szempontból a herpeszvírusok három, igen laza kapcsolatban álló csoportot képeznek. Egyik csoportjuk az emlősöket, madarakat és hüllőket fertőzi, egy másik csoportjuk a kétélűtüeket és halakat, míg a harmadik csoport a kagylókat. A csoportok közül az első, amely már alaposan jellemzett, három fő ágat foglal magába. Ezekről feltételezzük, hogy legkevesebb 200 millió évvel ezelőtt váltak szét, és mindegyik leágazási vonal körülbelül 40 gént örökölt a közös őstől. E vírusok evolúciója megközelítőleg egy vagy két nagyságrenddel gyorsabban folyt, mint gazdáiké, és diverzitásuk eléréséhez felhasználták a rendelkezésre álló valamennyi mechanizmust. A változatosság, ami megfigyelhető mind a fajon belül, mind pedig a fajok között, egyes vírusoknál (mint például a humán cytomegalovírus) különösen

szembeötlő. Így a herpeszvírusok evolúciójának viszonylag újabb történései is fokozatosan a kutatások fókuszába kerülnek.

Herpesviruses are enveloped, icosahedral viruses that replicate in the cell nucleus and are capable of latently infecting their hosts for life. These pathogens are found in a wide range of vertebrate animals, including humans, and also in shellfish, and the great majority are well adapted and highly host specific. Their linear, double-stranded DNA genomes are 125-240 kbp in size and contain about 70-170 genes. Complete sequences are available for over 30 species, and understanding of genomics and phylogeny is in an advanced, though still developing, state. As with other organisms, the outcomes of analyses aimed at describing gene layout have depended upon the criteria used. Comparative genomics has proved fundamental, supplemented by pattern-based bioinformatics approaches, information from expression studies, and phenotypic data. The reliability of such exercises has depended on taking a discerning approach and on maintaining the analyses within a strong virological context. Phylogenetically, herpesviruses fall into three tenuously related groups, one infecting mammals, birds and reptiles, one infecting amphibians and fish, and one infecting bivalves. The first of these groups has been characterized extensively, and comprises three major branches that are thought to have separated at least 200 million years ago, with each lineage having inherited about 40 genes from a common ancestor. These viruses have evolved at a rate one or two orders of magnitude faster than their hosts, and have employed all available mechanisms to generate diversity. Diversity is detectable within, as well as between, species, and is particularly striking for certain viruses (such as human cytomegalovirus). Consequently, the relatively recent evolution of herpesviruses is becoming a focus for investigation.

DEÁK JUDIT¹, VASS ZOLTÁN²

Különleges lokalizációjú *Mycobacterium tuberculosis* fertőzés

SZTE ÁOK ¹Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet; ²Fül-Orr- Gégészeti és Fej-, Nyaksebészeti Klinika, Szeged

Földünk lakosságának 1/3-a, 2 milliárd ember fertőzött mycobacteriumokkal. A fertőzések száma évről évre növekszik, az incidencia 8 millió, a halálesetek száma évente 2 millióra becsülhető. Az AIDS betegek, a hajléktalanok számának emelkedése, a migráció és az életszínvonal csökkenése következményeként világszerte növekszik a tuberculosis esetek ezen belül a multidrog rezisztens törzsekkel fertőzöttek száma.

Évekig tartó csökkenés után Magyarországon is emelkedik a *Mycobacterium tuberculosis* fertőzések száma. A fej-nyak régióban leírtak ritka manifesztációkat, az orbita és a periorbitális tájék, a nasolacrimalis csatorna és a szem fertőzéseit. Beszámoltak a nyelv, a gingiva, a nyelöcső, a gége infekcióiról és a mandibula osteomyelitiséről. Mastoiditis és parotitis gyulladásainak hátterében is előfordult a *Mycobacterium tuberculosis*.

A fiatal egészségügyi dolgozó 2001 novemberében jelentkezett fülfolyással egy megyei kórház fül-orr-gégészeti szakrendelésén, ahol öt hónapon át konzervatív kezelésben részesült, majd tympanoplasticat végeztek. Retroauricularis abscessusat incisioval, drainage-zsal kezelték. 2002. áprilisában került a szegedi Fül-Orr-Gégészeti és Fej-, Nyaksebészeti Klinikára, ahol először kértek bakteriológiai, HIV szerológiai vizsgálatot, továbbá kizárták a diabetest és a malignus folyamatot. 2002. augusztusában retroauricularis abscessus alakult ki. A Ziehl-Neelsen kenet festés, a *Mycobacterium tuberculosis* tenyésztés és a PCR vizsgálatok negatív eredménnyel zárultak. Novemberben fáradékonyság, fogyás, éjszakai izzadás, a testszerte megjelenő gennyes bőrelváltozások miatt empirikus antituberkulotikum kezelést kezdtek, előtte azonban újabb mintát vettek PCR vizsgálatra.

A krónikus otitisek hátterében előfordulhat *Mycobacterium tuberculosis* fertőzés. Az egészségügyi dolgozók fokozott veszélyeztetésnek vannak kitéve. Az INH, Pirazinamid, Rifamed és Sural kezelés hatására beteg állapota javult, azonban a fertőzésnek kitett oldalon hallását elvesztette, leszálalékolták.

DEEPAK SHUKLA^{1,2}, PERRY SCANLAN^{1,2}, VAIBHAV TIWARI^{1,2}, VEERAL SHETH¹,
CHRISTIAN CLEMENT^{1,2}, GRACE GUZMAN-HARTMAN³, TERENCE S. DERMODY^{4,5,6}, VÁLYI-
NAGY TIBOR³

Nectin-1 expresszió normál és herpes-simplex virus 1 típusával fertőzött egér agyban

University of Illinois at Chicago College of Medicine Departments of ¹Ophthalmology and Visual Sciences; ²Microbiology and Immunology; ³Pathology, Chicago; Vanderbilt University School of Medicine Departments of ⁴Pediatrics and Microbiology; ⁵Immunology; ⁶Elizabeth B. Lamb Center for Pediatric Research, Nashville, USA

A nectin-1 adherenciában szerepet játszó fehérje a neurotróp herpes simplex virus (HSV) receptora. A nectin-1 kifejeződéséről a központi idegrendszer sejtjein nem sokat tudunk. Az sem ismert, hogy a HSV fertőzésnek van-e valami hatása a nectin-1 kifejeződésére az agyban. A nectin-1 kifejeződésének jobb megismerése céljából immunhisztokémiai módszerrel tanulmányoztuk a nectin-1 kifejeződését fertőzetlen és HSV-1-el fertőzött egerek agyában. A fertőzetlen és fertőzött egerek központi idegrendszerében a nectin-1 kifejeződése a neuronokon, az ependymális sejteken, a choroid plexus epitheliális sejtjein, a meningoepitheliális sejteken és a vasculáris endothélium sejtjein volt kimutatható. Az oligodendrocytákon, astrocytákon és vasculáris sima izom sejteken a nectin-1 kifejeződés szintje változó volt. Az intracerebrálisan HSV-1-el fertőzött egerek agyi szövetében 5-8 nappal a fertőzés után a HSV-1 fehérjék nagymértékű kifejeződését figyeltük meg a neuronokban és gyulladós sejtekben. Továbbá, a fertőzött agyban a nectin-1 kifejeződés jellege megváltozott: a HSV-1-el fertőzött egerek agyában lévő gyulladós góccok sejtjein nagymértékben változó volt a nectin-1 kifejeződés, a fertőzetlen agyi sejteken lévő egységes kifejeződéssel szemben. Ezek a eredmények azt jelentik, hogy a HSV-1 fertőzés a nectin-1 kifejeződés megváltozásához vezet a központi idegrendszer sejtjein, amely hozzájárulhat a HSV-1 fertőzés pathológiájához.

DENCS ÁGNES, TAKÁCS MÁRIA, BERENCSI GYÖRGY

Phylogenetic relationship of SENV and TTV

Johan Béla OEK Virologiai Főosztály, Budapest

A SEN vírust egy poszttranszfúziós hepatitisben szenvedő betegben fedezték fel Olaszországban 2000-ben. Azóta kiderült, hogy a TT víruscsalád tagja. Cirkuláris, körülbelül 3,8kb hosszúságú egyszálú DNS genomot tartalmaz. Eddig két átfedő, nyitott leolvasási keretet azonosítottak, amik rendkívül nagy változékonyságot mutatnak. A SEN vírusnak eddig 8 genotípusát írták le (A-H). Ezek közül általában a D és a H genotípusokat vizsgálják részletesebben, mert ezekről feltételezik, hogy a nem-A nem-E hepatitisek egy részének kórokozói. A SENV rendszertani besorolása még bizonytalan. Egyesek a Circoviridae családon belül az Anellovirus genusba sorolják a TTV mellett, mások szerint azonban nem tekinthető a TTV-től különböző vírusnak: a SENV genotípusai megfeleltethetők a TTV 3. csoportba tartozó genotípusainak. Ez utóbbi eredmény a TTV és a SENV genomok nem transzlálódó régiójának nukleotidsorrend-vizsgálata alapján született. A SEN vírus kimutatását általában a kódoló régióra tervezett polimeráz láncreakcióval végzik. Vizsgálataink célja az általunk használt primerekkel felszaporított szekvenciák genotipizálása volt. Ezzel egyidőben információt szereztünk a TTV és SENV genotípusok kódoló régióinak hasonlóságairól és eltéréseiről.

Nukleotidsorrend-vizsgálatok alapján a SEN vírus D és H genotípusaira tervezett primerek specificitása jónak bizonyult, a SEN vírus kimutatására szolgáló vizsgálat azonban keresztreakciót mutatott: sok esetben olyan szekvenciát eredményezett, amely legjobban bizonyos TTV genotípusokhoz (TUPB, TUS01) hasonlított. Ezek a TTV genotípusok a TTV 3. csoportjába tartoznak, azonban a vizsgált szakaszon jóval nagyobb hasonlóságot mutatnak a SEN vírus B genotípusával, mint más TT vírusokkal, ami magyarázat lehet a keresztreakcióra. A kapott szekvenciákat az irodalomban közölt SENV és TTV genomok megfelelő szakaszaival illesztettük és filogenetikai fát készítettünk kapcsolataik ábrázolására. Vizsgálataink azt mutatják, hogy a kódoló régió általunk vizsgált szakasza alapján a SENV genotípusai elkülöníthetők egymástól, arra azonban nem alkalmas, hogy a SENV és a TT vírust megkülönböztessük.

SEN virus was isolated from the serum of a patient with post-transfusion hepatitis in Italy in 2000. Since then it has been shown to belong to the TT virus family. The genome of SENV is circular single-

stranded DNA of about 3,8 kilobases. So far two overlapping open reading frames have been identified, which are highly variable. SENV isolates are classified into 8 genotypes (A-H). Two of them (D and H) have been studied extensively, because they are suspected to be responsible for some of the non-A non-E hepatitis cases. The classification of SENV is not clear yet. Some classify it into a new genus called Anellovirus within the Circoviridae family. However, others believe it cannot be considered a separate virus from TTV, SENV genotypes are actually TTV strains belonging to TTV group 3. This observation is based on the analysis of the untranslated region of the genome. SENV can be detected by polymerase chain reaction designed for the coding region.

The aim of our study was to determine the genotypes of the SEN viruses amplified by our primers. We also acquired information on the similarities and differences in the coding regions of SENV and TTV genotypes.

By sequencing the PCR products it was found that the genotyping primer sets designed for genotypes D and H were specific. However the general SENV primers proved to cross-react: in many cases the product they amplified showed the highest similarity to certain TTV isolates (TUPB, TUS01). These TTV strains belong to TTV group 3, but this region of their genome seems to be more similar to SENV-B than other TTV strains, which might explain the cross-reaction. The obtained sequences were aligned with the corresponding regions of published SENV and TTV genomes. Phylogenetic trees were constructed to illustrate their phylogenetic relationship.

Our study shows that the stretch of the coding region we examined is suitable for determining SENV genotypes, but it cannot be used to distinguish between SENV and TTV.

DOBAY ORSOLYA^{1,2}, ROZGONYI FERENC¹, SEBASTIEN G.B. AMYES²

Makrolid rezisztens pneumococcusok 23S rRNS-ének és riboszomális fehérjéinek szekvenálási eredményei

¹Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Budapest; ²Department of Medical Microbiology University of Edinburgh, UK

Magyarországon a *Streptococcus pneumoniae* törzsek makrolid rezisztenciája 35-40% körüli. Hasonlóan az európai helyzethez, a két fő rezisztencia mechanizmus nálunk is a kémiai módosítás Erm enzimekkel, illetve a *mef* gének által kódolt efflux pumpa. Az utóbbi években azonban egyre növekvő gyakorisággal írnak le mutációkat a riboszomális RNS-ben illetve fehérjékben. Miután 122 makrolid rezisztens törzset leteszteltünk az *erm* és *mef* gének jelenlétére, mutációkat kerestünk abban a 9 törzsből, amelyek vagy negatívak voltak az összes vizsgált rezisztencia determinánsra (n=3), vagy szokatlan rezisztencia fenotípust mutáltak (n=3), vagy emelkedett quinupristin/dalfopristin (Q/D) MIC-cel rendelkeztek (n=3). A 23S rRNS II és V domain-jét, valamint a teljes L4 és L22 riboszomális fehérjét amplifikáltuk, majd a PCR termékeket tisztítás után szekvenálásra küldtük. A törzseket szerotipizáltuk és PFGE genotipizáltuk.

Három *mef(E)* génnel rendelkező törzs a szokásos M fenotípus helyett magas szintű makrolid és clindamycin rezisztenciát mutatott. Mindhárom ugyanazokat a mutációkat tartalmazta a 23S rRNS-ben: a már korábban leírt T389C báziscsere mellett új mutációkat találtunk a ₆₈₂ACC→GAA₆₈₄ és T676C pozíciókban. A két utóbbi hely közelsége fontos makrolid kötőhely jelenlétére utalhat. A három törzs genetikailag azonos volt és rokon a PMEN Taiwan^{19F}-14 klónnal is, valamint szintén 19F szerotípust fejeztek ki.

Az egyetlen 2 mg/L Q/D MIC-cel rendelkező törzs mindössze egy báziscserét tartalmazott a 23S rRNS II domain-jében (T552C). Az egyik 1 mg/L Q/D MIC-es törzs teljes genetikai azonosságot mutatott az egyik "negatív" törzsszel, és ugyanazokat a mutációkat is tartalmazták (egy új és két ismert mutáció a domain II-ben, illetve egy új E3D aminosav csere az L22-ben). Mindketten 6-os szerocsoportúak voltak és ugyanazon laboratóriumban is izolálták őket. Ezzel szemben a másik 1 mg/L-es Q/D MIC-cel rendelkező törzs, amely szintén azonos mutációkat mutatott az egyik "negatív" törzsszel (1-1 már ismert mutáció a domain II-ben illetve az L4-ben), attól genetikailag, térben és időben is független volt. Mindkét esetben azonban a magasabb Q/D MIC-cel rendelkező törzsek magasabb erythromycin és clindamycin rezisztenciával is rendelkeztek, amit az *erm(B)* gén jelenlétével lehet magyarázni. Érdekes módon a 23S rRNS V domain-jében nem találtunk mutációkat, holott eddig ott írták le a legtöbbet.

Magyar makrolid rezisztens pneumococcusokat eddig nagyon kevés esetben vizsgálták riboszomális

mutációra, csak a nemzetközi tanulmányok keretében néhányat. Ezenkívül ez az első leírások egyike indokolatlanul magas szintű makrolid és clindamycin rezisztenciával rendelkező, *mef* gént tartalmazó törzsekről. Érdekes új mutációkat írtunk le a vizsgált izolátumok 23S rRNS-ében és riboszomális fehérjéiben.

EL-BAHY, NASR M.

Detection of circulating filarial antigen

Minufiya University Faculty of Veterinary Medicine Department of Parasitology, Egypt

Diagnosis of filariasis by immunodiagnostic tests did not prove satisfactory since they both failed to distinguish between active and past infections and had problems with specificity owing to their cross-reactivity with common gastrointestinal parasites.

Circulating filarial antigen detection regarded as the most specific and highly sensitive way for diagnosing infections. The specificity of these assays is near complete, and the sensitivity is greater than that achievable by the earlier parasite-detection assays. Essentially all individuals with microfilaraemia also have detectable circulating antigen, as well as do a proportion of those amicrofilaraemic individuals with clinical manifestations of filariasis (e.g., lymphoedema or elephantiasis) but no circulating microfilariae. Two commercial configurations for evaluation of bancroftian filariasis infections are available, one based on ELISA methodology that yields semi-quantitative results, and the other based on a simple card (immunochromatographic) test, yielding only qualitative (positive/negative) answers.

In this study three different ES antigens were achieved from the infective larvae. Three different molecular weight antigens were developed. The first one at 20-25 KDa from *Wucheraria bancrofti* infective larvae ES products, the second one at 70-75 Kda from *Onchocerca volvulus* and the third at 40-45 KDa from *Brugia miyli* infective larvae. Monoclonal antibodies were developed for each protein fraction.

Serum samples of experimentally infected hamster were tested for the presence of circulating antigen by modified agglutination test (MAT), which is a quantitative test. The sensitivity rates were 9/10 for *Wucheraria bancrofti* and *Onchocerca volvulus* and 8/10 for *Brugia* infection at end point titer 1/100. On the other side, there was no interaction or cross reaction detected when pooled serum samples were tested.

EMÖDY LEVENTE

A normál mikrobiota és a kórfolyamatokban résztvevő mikrobák – evolúciós és gyakorlati vonatkozások

PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet, Pécs

A normál mikrobiota a rezidens és tranziens flóratagok jelenléte révén a hagyományosan ismert funkciók mellett egy olyan rezervoárt is képez, amely horizontális géntranszfer útján a kórokozó tulajdonságokért felelős gének kicserélődésének széles lehetőségét biztosítja. A mikrobák különböző gazdafajok közötti cirkulációja során a géncserék azonos, vagy különböző fajokba tartozó mikrobák között is létrejöhetnek. Ezek a pathoadaptációs folyamatok a virulencia fokozódásában, a gazdafajlagosság meghatározásában és a gazdaszervezeten belüli topizmusban egyaránt szerepet játszhatnak.

A vitaindító ismert bakteriális toxinok, kolonizációs és inváziós faktorok példáin keresztül a normál mikrobiális flórának a virulencia evolúciójában betöltött szerepére koncentrálnak, emellett exponálnak a (differenciál)diagnosztikai és egyéb gyakorlati területeken (taxonomia, molekuláris epidemiológia, terápia és prevenció) történő alkalmazás lehetőségeit.

EMRI TAMÁS, MOLNÁR ZSOLT, PUSZTAHELYI TÜNDE, LEITER ÉVA, PÓCSI ISTVÁN

Az autolízis és az apoptózis kapcsolatának vizsgálata *Aspergillus nidulans* fonalas gombában

DE TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék, Debrecen

A gombák autolízise egy aktív, energiaigényes, genetikailag szabályozott sejtpusztulási folyamat, amely

sok hasonlóságot mutat a magasabb rendű eukarióták apoptózisával. A gombák sejthalálának a bonyolultságát jellemzi, hogy szoros értelemben vett apoptózis, vagy apoptózis-szerű folyamatok gombákban is előfordulnak (1). Sajnos, kevés információ áll a rendelkezésünkre a gombák apoptózisában és autolízisében szerepet játszó génekről, és ezen gének szabályozása még szintén felderítésre vár. A jelenleg e területen folytatott kutatások révén választ szeretnénk kapni arra a kérdésre, hogy a gombák apoptózisa és autolízise vajon ugyanazon géntermékeken és szabályozási mechanizmusokon alapulnak-e, vagy, alternatívaként, a gombák programozott sejthalálának két, egymástól független formájáról van szó.

Kísérleteinkben az *Aspergillus nidulans* autolízisét szénforrás limitációval váltottuk ki, és ezt a folyamatot jól lehetett jellemezni az extracelluláris kitináz és proteáz termelés növekedésével, valamint a szárazanyag tartalom gyors csökkenésével. Az ilyen autolizáló tenyészetekben jelentősen megemelkedett, az exponenciálisan növekedő tenyészetekhez mérten körülbelül tízszeresére nőtt, az apoptózis markereket mutató sejtek aránya.

Korábbi tapasztalataink alapján (1) az autolízis jól gátolható akár E vitamin adagolásával akár a *fluG* gén "loss-of-function" mutációjával. Meglepő módon azonban sem az E vitaminnal való kezelés sem a *fluG* gén mutációja nem befolyásolta a sejtek korfüggő vitalitását és az apoptotikus sejtek arányát.

Ismert, hogy szfingozin származékokkal az *A. nidulans* apoptózisa indukálható (2). A fitoszfingozin és a D,L-dihidroszfingozin kezelés az autolizáló tenyészetekben 2-3-szorosára növelte az apoptotikus sejtek arányát, de nem okozott változást a szárazanyag tartalom csökkenésében és az extracelluláris hidroláz termelésben.

Összegezve, az *A. nidulans* autolízise és apoptózisa két különböző, egymástól független élettani folyamatnak tűnik.

Irodalom:

1. Emri, T., Molnár, Zs., Pusztahelyi, T., Rosén, S. and Pócsi, I. (2004) Effect of vitamin E on autolysis and sporulation of *Aspergillus nidulans*. Appl. Biochem. Biotechnol., in press
2. Cheng, J., Park, T.S., Chio, L.C., Fischl, A.S. and Ye, X.S. 2003. Induction of apoptosis by sphingoid long-chain bases in *Aspergillus nidulans*. Mol. Cell Biol. 23, 163-177.

EMRI TAMÁS, PUSZTAHELYI TÜNDE, MOLNÁR ZSOLT, PÓCSI ISTVÁN

A FluG fehérje nélkülözhetetlen az *Aspergillus nidulans* autolízisének iniciálásában

DE TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék, Debrecen

A növekedés és a spórázás egyensúlyát két jelátviteli útvonal, a *fluG-brlA* és a *fadA/sfaD-pkA* útvonal szabályozza az *Aspergillus nidulans* fonalas gombában. A két útvonal közötti kapcsolatot a *fluG* gén biztosítja. Az *Aspergillus nidulans fluG* génje a prokarióták glutamin szintáz I enzimével homológ, citoszólikus fehérjét kódol. Az e fehérje által képzett, hipotetikus, diffúzibilis molekuláról feltételezik, hogy egyszerre képes aktiválni a sporulációt - a BrlA transzkripció faktor indukcióján keresztül - és leállítani a növekedést az FlbA fehérje - a FadA/SfaD G protein által mediált jelátviteli útvonal negatív regulátora - aktiválásával. Vizsgálataink alapján a FluG fehérje nélkülözhetetlennek bizonyult az *Aspergillus nidulans* autolízisének iniciálásában is szénforrás limitált, öregedő, süllyesztett tenyészetekben. Egy, a *fluG* génben defektes mutáns vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a FluG fehérje részt vett az extracelluláris kitináz és proteáz termelésének, a pelletek szétesésének, a szárazanyag tartalom csökkenésének és a fonalak fragmentálódásának szabályozásában, ugyanakkor nem befolyásolta számottevően az élő sejtszám csökkenését. A *fluG* gén autolízisre gyakorolt hatása jól demonstrálja, hogy az autolízis egy genetikailag szabályozott, aktív folyamat, amely csak egy a sejtek pusztulását eredményező hatások közül. Minthogy a *fluG* génben defektes mutáns autolízisét a vad típusú törzs fermentlevének, illetve micéliumának adagolásával ki lehetett váltani, vizsgálataink alátámasztják azt a hipotézist is, miszerint a FluG egy kis molekulatömegű, diffúzibilis, extracelluláris faktor termelésén keresztül fejti ki hatását.

ERDÉLYI BALÁZS, SZABÓ ANTAL, SZÉLL VALÉRIA, IVANICS JÓZSEF, ILA LAJOS, BIRINCSIK LÁSZLÓ

A Primycin 50 éves története és fermentációs előállításának újdonságai

IVAX Gyógyszerkutató Intézet Kft., Budapest

Az első originális, magyar kutatócsoport által izolált és leírt antibiotikum a primycin. A Gram-pozitív baktériumokkal, valamint a *Mycobacterium* nemzetségbe tartozó fajokkal szembeni antibakteriális hatását Vályi-Nagy és társai 1954-ben írták le¹, főkomponensének pontos szerkezetét azonban csak 1970-ben határozták meg kanadai kutatók². A tú formájú kristályokból álló, homológ makrolid komplex színe az izolálás minősége szerint a sárgás-fehértől a hófehérig változhat. A primycin alkoholtartalmú gél kiszerezésben, Ebrimycin márkanév alatt, 1986-ban került forgalomba Magyarországon. Jelenleg a készítmény hazai gyógyszertárakban nem kapható.

A primycin termelő törzset a viaszmosy lárvájának ürülékéből és béltraktusából izolálták¹. A morfológiailag az *Actinomycetes* nemzetségbe tartozó törzset először *Streptomyces primycini*-ként nevezték meg, később *Thermopolyspora galeriensis*, majd *Micromonospora galeriensis* fajnak sorolták be³. A primycin fermentációs előállítását már 1969-ben 1000 literes térfogatban sikeresen elvégezték⁴. Intézetünkben 30 évvel később hasonló méretű fermentorban készült primycin tartalmú fermentlé. Előadásunkban a léptéknövelés, a fermentáció, valamint a feldolgozás fejlesztéséről számolunk be.

1. Vályi-Nagy T., Uri J., Szilágyi I., *Nature* **174** (1954) 1105.

2. Aberhart T. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **92** (1970) 5816.

3. Szabó I. M. et al., *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* **23** (1976) 371.

4. Vályi-Nagy T., Kulcsár G., *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* **20** (1969) 127.

ERŐS-HONTI ZSOLT, JAKUCS ERZSÉBET

A Thelephorales rend molekuláris taxonómiai vizsgálata

ELTE TTK Növény szerkezettani Tanszék, Budapest

A Thelephorales (Basidiomycota) rendre általánosan jellemző a pigmentált, mintázott, nem amiloid, szabálytalan alakú vagy lebenyes spóra, melynek nagy apikususa van. A termőtestek alakja a reszupinátustól a felemelkedő, klavarioid formán át a pilotéciumig változhat. A termőtesteket főleg talajon vagy korhadó fán találjuk meg. A fajok egy része szaprotróf, más része ektomikorrhiza képző. A morfológiai alapon nyugvó rendszerezés ellentmondásai miatt a rend tagjainak taxonómiai helyzete igen vitatott. Munkánk során a Thelephorales rend különböző csoportjaiból választott 44 reprezentatív faj nrDNS ITS régiójának a GenBank adatbázisból származó nukleotidszekeveenciáit (405 nukleotidpozíció) vizsgáltuk kladisztikai (neighbor-joining, maximum likelihood és maximum parsimony), valamint numerikus taxonómiai (ordinációs) módszerekkel. A különböző módszerek eredményei igen hasonlóak. A kapott csoportok jól elkülönülő és statisztikailag is megerősített kládokban helyezkednek el a törzsfákon. A két fő csoport összetétele azonban ellentmond a rend korábbi, két családra (Bankeraceae és Thelephoraceae) történő felosztásának. A termőtest-morfológia és a spóraszerkezet elkülönítő szerepét molekuláris eredményeink nem támasztják alá.

FÁRI MIKLÓS GÁBOR

Bioreaktorok a növények szaporításában

DE ATC Zöldségtermesztési Tanszék, Orsós Ottó Kertészeti Biotechnológiai Laboratórium Debrecen

A növények *in vitro* klónszaporítása világszerte elterjedt, de nagy kézimunkaerőt igénylő, ígéretes biotechnológiai módszer. Elterjedését az is korlátozza, hogy bizonyos fajok és fajták csak nehezen tenyészthetők, és/vagy nem fejlődnek tökéletesen az eddig alkalmazott *in vitro* nevelési feltételek között. Ennek egyik közismert magyarázata, hogy az agar-agarral és más anyagokkal gélesztett táptalajok nem megfelelően szolgálják a növények tökéletes tápanyagfelvételét és növekedését. A hagyományos tenyésztő edényekről ismert, hogy a külső fertőzések kizárása általában azzal a következménnyel jár, hogy a belső gáztérben a hormonhatású, a biológiai öregedést kiváltó etilén halmozódik fel. A

mikroszaporító bioreaktorok a mesterséges megvilágítással ellátott, ún. fito-bioreaktorok egyik legújabb alcsoportját képezik. Közös jellemzőjük, hogy vegetatív szövetek, pl. rügyek, hajtások, továbbá gyökerek optimális növekedésének programozott irányítására alkalmasak, az *in vitro* morfogenezist markánsan befolyásoló legfontosabb külső tényezők (fény minősége és mennyisége, illetve a belső gáztér) szabályozásával. A magyar fejlesztésű 3R mikroszaporító bioreaktor* a kutatást és az üzemi szaporítást rugalmasan kiszolgáló, új moduláris rendszer. Fő részei: (1) aszeptikus, autoklávozható műanyag tenyésztő modulok; (2) levegőtető- és CO₂-kezelő rendszer; (3) szabályozott megvilágítás (4) kézi és/vagy számítógépes programozó-vezérlő egység; (5) adatgyűjtő egység. A tenyésztő modulokba sterilen elhelyezett inokulumok előre programozott módon érintkeznek a folyékony táptalajjal, cserélődik ki körülöttük a levegő, irányítottan változik a CO₂ koncentráció, tovább módosul a megvilágítás intenzitása, illetve a fény-sötét periódusok hossza és gyakorisága. A 3R bioreaktor jelentősen növeli mind a szaporítási fázis, mind a gyökereztetési fázis hatékonyságát. A hat modulból álló 3R kísérleti bioreaktor összesen 3.000 ml folyékony táptalaján hat hét alatt - 300 ananász inokulumból - 3000 db, 0,5 cm-nél nagyobb új hajtás képződött. A kiinduló táptalaj tömegének fele a növények szövetébe oly módon épült be, hogy azok szárazanyag tartalma a kontrollal azonos volt, miközben friss súlyuk 3-4-szer volt több. Hasonló tapasztalatokat szereztünk banán és sok más kultúrákkal is. A fotoszintetikus aktivitás változását infravörös gázanalizátorral vizsgálva megállapítottuk, hogy a 3R bioreaktorban nevelt növények banán és ananász fotoszintézise kialakult, aktivitásuk a légzést felülmúlta. A 3R bioreaktorban előállított növények levelének klorofill-tartalma megnőtt, szövettani felépítésük normális volt. A 3R bioreaktor tenyésztő moduljaiban nevelt 'in plastic' növények autotróf életmódjuk lehetővé tette a kiültetés okozta stressz leküzdését.

* A kutatásokat Az AGROINVEST Rt (Budapest) által koordinált, OM BIO 0136/2000 sz. program támogatta.

FARKAS BALÁZS, TAKÁCS MÁRIA

A hepatitis c vírus hipervariábilis régiójának vizsgálata vírushordozókban

Johan Béla OEK Virologiai Osztály, Budapest

A hepatitis C vírus (HCV) krónikus fertőzést okoz a megfertőződöttek jelentős részében. Létezik tünetmentes hordozás, de az esetek többségében a vírus májbetegséget okoz. A hepatitis C vírus a Flaviviridae családba tartozik, genomja pozitív egyszálú lineáris RNS. A HCV-nek hat genotípusa ismert. A hepatitis C ellen még nem dolgoztak ki vakcinát, elsősorban a vírus nagyfokú variabilitása miatt.

A vizsgálat célja az volt, hogy kimutassuk, a hepatitis C vírus E2 hipervariábilis régiójának szekvenciája mennyire különbözik az egyes betegekben. Megvizsgáltuk, hogy van-e kimutatható különbség ebben a régióban a beteg, illetve a tünetmentes egyénekben perzisztáló vírusok szekvenciái között.

Nukleinsav kivonás után nested RT PCR technikát alkalmaztunk, majd a PCR terméket szekvenáltuk. A szekvenciákat FastA és ClustalW módszerrel hasonlítottuk össze egymással és a szakirodalomban közölt vírusszekvenciákkal, majd filogenetikai fát készítettünk.

Minden betegből és tünetmentes hordozóból származó vírus nukleotid szekvenciája különböző volt a vizsgált szakaszon. A nukleotidok kb. negyedében tapasztaltunk változékonyságot. Egyes nukleotid polimorfizmusok aminosav különbözőséggel jártak, de az esetek több, mint a kétharmadában a nukleotid-szekvencia eltérése nem okozott aminosav-sorrend változást. A tünetes és tünetmentes betegcsoportból származó szekvenciákban nem találtunk csoportra jellemző mintázatot.

A hepatitis C vírus E2 régiójának szekvenciája - változékonysága miatt - jól használható epidemiológiai nyomkövetéses vizsgálatokra. Érdeemes lenne a különböző területeken élő személyek vírusainak szekvenciáit megvizsgálni.

FARKAS JÓZSEF^{1,2}, ANDRÁSSY ÉVA^{1,2}, POLYÁKNÉ FEHÉR KATALIN¹

Két hűtött félkész-étel mikrobiológiai biztonságának javítása gamma sugárzással

¹BCE Hűtő- és Állattermék-Technológiai Tanszék; ²Központi Élelmiszer-tudományi Kutató Intézet, Budapest

Növekvő érdeklődés van módosított légtérrel csomagolt készételek hűtött körülmények közötti forgalmazása iránt. Patogén mikroorganizmusok esetleges túlélése és/vagy velük az élelmiszer-

feldolgozást követően, de a csomagolást megelőzően bekövetkező termék-szennyeződés azonban kockázatot jelent, különösen helytelen hőmérsékleti viszonyok esetén. Munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk e mikrobiológiai kockázatnak gamma sugárzással való csökkentése lehetőségét két ilyen élelmiszer-típus, a 'Tortellini' nevű tésztakészítmény és a rekonstruált pulyka-mellhúsból sajt- és sonka-töltettel gyártott, s panírozottan enyhe elősütéssel előállított, Cordon Bleu-nek nevezett készítmény esetén. A kísérleti tételeket, amelyeknek az összetétele a kereskedelmi készítményekének megfelelő volt kb. 10^4 KKE/g *Staphylococcus aureus*-szal (Tortellini), ill. kb. 10^6 KKE/g *Listeria monocytogenes*-szal (Cordon Bleu) oltottuk be 20 % CO₂ és 80 % N₂ gázösszetételű csomagolást megelőzően. A beoltott csomagokat 3 kGy (Tortellini), ill. 2 kGy (Cordon Bleu) sugáradagokkal kezeltük egy ⁶⁰Co sugárforrással. A Tortellini kísérleti tételeit 15 °C-on, a Cordon Bleu-ét 5, valamint 9 °C hőmérsékleteken tartottuk. A besugárzott csomagokkal együtt tároltunk megfelelő kezeletlen mintákat is. A tárolás 4 hétig történt. A besugárzás előtt és után, majd a tárolás közben hétnaponként mikrobiológiai vizsgálatokat végeztünk. A tesztorganizmusok élőcsíraszámának szelektív meghatározása mellett az összes aerob élőcsíraszámokat, a tejsavbaktériumok, az Enterobacteriaceae, a szulfitredukáló klosztridiumok, valamint az élesztők és a penészgombák számát is követtük. A 3 kGy-s sugáradag a Tortelliniben a *Staph. aureus* élőcsíraszámát a kimutatási határ (\log_{10} KKE/g = 0.26) alá csökkentette, s a tesztorganizmus élőcsíraszámja kimutathatatlanul alacsony volt a besugárzott mintákban a 28 napos tárolás egész időtartama folyamán, míg a *Staph. aureus* szám a besugárzatlan mintákban a 8. napra már 10^8 KKE/g szintre növekedett. A Cordon Bleu-ben a *Listeria* számot a sugárkezelés 6.1 logaritmusos egységnyiről 3.5 logaritmusos egységnyire csökkentette. Az 5 °C-os tárolás esetén ez a maradék csíraszám 3-4 héten át stagnált, 9 °C-on azonban egy hét után növekedni kezdett. A besugározatlan mintákban a *Listeria*-szám 5 °C-on 4 hét alatt, 9 °C-on két hét alatt megszázaszorozódott. A szulfit-redukáló klosztridiumok esetleges száma a kimutatási határ alatti (\log_{10} KKE/g < 0.48) volt minden mintában legalább 3 hétig, még 9 °C-on is. Az eltarthatóságot korlátozó tényezőt ezen a helytelen tárolási hőmérsékleten a tejsavbaktériumok elszaporodása jelentette. Vizsgálatainkból az a következtetés vonható le, hogy a kísérleti termékek mikrobiológiai kockázatát a vizsgált spórátlan patogén baktériumokat illetően a sugárkezelésnek a termékek érzékszervi minőségét még nem rontó dózisaival jelentősen csökkenteni lehetne. A megfelelő tárolási hőmérséklet azonban a mikrobiológiai biztonságnak kulcs-tényezője.

E munkát az IAEA No. 11905/RB1 kutatási szerződés keretében végeztük.

FEKETE ANDREA^{1,2}, EMRI TAMÁS², GAZDAG ZOLTÁN³, BLASKÓ ÁGNES³, MAJOROS LÁSZLÓ¹, NAGY EMŐKE⁴, BALLA JÓZSEF⁵, VARGA ZSUZSA⁶, PESTI MIKLÓS³, PÓCSI ISTVÁN², GERGELY LAJOS¹

Egy lipid-peroxid toleráns *Candida albicans* mutáns jellemzése

¹DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet; ²DE TTK Mikrobiológiai és Biotechnológia Tanszék, Debrecen; ³PTE TTK Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék, Pécs

A fagocitózishoz kötődő "respirációs burst" aktiválódása során a fagocita sejtek sokféle reaktív oxigén gyököt (ROS) termelnek, amely a patogén fajokban a káros hidroxil gyökök és lipid peroxidok emelkedett szintjét eredményezik. A patogén gombák képesek adaptálódni a ROS emelkedett szintjéhez az antioxidáns enzimek termelésének, illetve a különböző antioxidáns molekulák mennyiségének fokozásával.

Kísérletünk során a lipid peroxid koncentráció növelésével létrehoztunk egy stabil, lipid peroxid (*tert*-butyl hydroperoxide, *tert*-BOOH) toleráns mutáns törzset (*lip-1*) ($MIC_{tert-BOOH}=16$ mM) a *Candida albicans* ATCC 14053 szülői törzsből (*lip*⁺) ($MIC_{tert-BOOH}=4$ mM).

A mutáns törzset a különböző oxidatív stresszt okozó vegyületekkel (H₂O₂, menadione, diamid, HOCl) és antifungális szerekkel (amphoterycin B, nystatin) szemben megnövekedett rezisztencia jellemezte. Ugyanakkor, várakozásunkkal ellentétesen, kukoricaliszt táptalajon vizsgálva a mutáns hifaképzés képessége kisebb volt és a patogenitása is csökkent, amit specifikus patogén-mentes NMRI egereken teszteltünk.

A megnövekedett oxidatív stressz toleranciát a jelentősen megnövekedett specifikus aktivitású antioxidáns enzimeknek (glutation reduktáz, glutation peroxidáz, glükóz-6-foszfát dehidrogenáz) tulajdoníthatjuk, amelynek eredményeként a szülői törzshöz viszonyítva az intracelluláris szuperoxid,

peroxid és hidroxil gyökök szintje alacsonyabb lett.

A mutáns törzs lényegesen rosszabb növekedést mutatott olyan minimál tápoldatban, ahol a glicerol (1.1 - 110mM) volt az egyetlen szénforrás. Figyelembe véve azt, hogy a glicerol egyszerű diffúzióval jut be a *Candida* sejtekbe, azt feltételeztük, hogy az általunk előidézett mutáció negatívan befolyásolja a plazmamembrán fluiditást és ennél fogva a permeabilitást is. Ezzel összhangban jelentősen alacsonyabb mennyiségű egyszeresen telítetlen zsírsavat (palmitoleinsav: C16:1; olajsav: C18:1) és többszörösen telítetlen zsírsavat (linolsav C18:2; linolénsav C18:3) ($p < 0.03$) mutattunk ki a mutáns törzsben. Ugyanakkor a mutáns sejtek magasabb koncentrációban tartalmaztak lipid peroxidokat, konjugált diéneket és malondialdehidet, jelezvén a telítetlen zsírsavak folyamatos oxidatív degradációját. A telített zsírsavak aránya a mutáns törzsben jelentősen megnövekedett (palmitinsav: C16:0; sztearinsav: C18:0), miközben lecsökkent a mirisztinsav (C14:0) mennyisége. A neutrális lipid frakció pedig jelentősen alacsonyabb mennyiségű ergoszterolt ($p < 0.05$) és szabad zsírsavat ($p < 0.03$) tartalmazott, míg a definiálatlan ergoszterol származékok, valamint a diacilglicerol mennyisége is szignifikánsan magasabb volt.

A mutáns törzsben lecsökkent a mitokondriális alternatív (cianid-rezisztens) légzés aktivitása, amely a belső membrán redox potenciáljának csökkenését eredményezheti. Ez a hipotézis előrevetíti a mitokondrium állandósuló ROS termelését, a telítetlen zsírsavak folyamatos degradációját és az antioxidatív védelmi rendszer folyamatos indukcióját.

FEKETE ERZSÉBET^{1,2}, CHRISTIAN GAMAUF², BERNHARD SEIBOTH²

A *Hypocrea jecorina* gomba aldóz reduktáz génjeinek izolálása, klónozása és expressziója

¹DE TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék, Debrecen; ²TU Bereich Molekulare Biotechnologie Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften, Wien, Österreich

Gombákban a D-xilóz, L-arabinóz és D-galaktóz lebontásakor a NADPH-függő aldóz reduktáz enzimek (EC 1.1.1.21) végzik a megfelelő poliollá történő redukciót. A *Hypocrea jecorina* (anamorph: *Trichoderma reesei*) gombában a xilóz reduktázt kódoló *xyII* gén is az aldóz reduktáz enzimesaládhoz tartozik. A Northern analízis eredményei szerint a *xyII* transzkriptum D-xylózon és L-arabinózon a legbőségebb, D-galaktózon és laktózon kisebb mértékű az átíródás. A *xyII* hiánymutáns nem csak D-xilózon, de L-arabinózon és D-galaktózon is csökkent mértékben nőtt, jelezve, a gén az utóbbi két szénforrás hsznosításában is szerepet játszik. A *xyII* mutáns *H. jecorina* sejtmentes kivonatában maradvány aldóz reduktáz aktivitást találtunk, magyarázatául a növekedés részbeni megmaradásának. A maradék aktivitásért felelős aldóz reduktáz(ok) felderítése céljából a *Trichoderma* genom adatbázisban (<http://shake.jgi-psf.org/trire1/trire1.home.html>) D-xilóz reduktázzal homológ szekvenciákat kerestünk, és további öt aldóz reduktázt (*alr1-5*) azonosítottunk. Hogy eldönthessük, melyik vagy melyek vesznek részt ténylegesen a D-xilóz, L-arabinóz és D-galaktóz lebontásában, összehasonlítottuk az öt gén kifejeződését különböző szénforrásokon a vad típusban és a *xyII* hiánymutáns *H. jecorina* törzsekben, majd *Pichia pastoris* élesztőben „overexpresszáltuk” a géneket, meghatározandó az átíródó fehérjék szubsztrát specifitását.

FEKETE PÉTER ZSOLT¹, OLASZ FERENC², GABRIELE BLUM-OEHLER³, NAGY BÉLA¹

F18+ enterotoxikus *Escherichia coli* törzsek virulencia plazmidjainak jellemzése

¹MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet, Budapest; ²Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ, Gödöllő; ³Institut für Molekulare Infektionsbiologie Universität Würzburg, Germany

Az újszülött és választott malacok hasmenését leggyakrabban okozó K88+ enterotoxikus *E. coli* (ETEC) törzsek mellett az utóbbi időben egyre több kutató figyelme fordul a kizárólag választott malacokban megtelepedő F18+ ETEC törzsek felé, melyek malacokban -érdekes módon- szinte kizárólag hőstabil toxinokat (STa, STb) termelnek. Az elmúlt években egy ilyen F18+ ETEC prototípus törzs (Ec2173) részletes vizsgálatának eredményeként néhány rész adatot közöltünk (Fekete és mtsai, MMT összefoglalók, 1997, 1998, 2000, 2001), melyek kiegészítését és szintézisét az alábbiak szerint ismertetjük. Az F18+ ETEC törzsek valamennyi jellemző tulajdonságával rendelkező Ec2173-as (O147, NM, Hly+, F18ac+) hazai izolátum legalább 3 nagy plazmíddal rendelkezik. Ezek közül az Ec2173-as

enterotoxin génjeit (sta, stb) valamint tetraciklin rezisztencia génjét a pTC jelű, mintegy 120kb méretű konjugatív plazmid hordozza. Előzetes munkáink során e plazmid több, a gazdatörzs virulencia jellemzőit befolyásoló tulajdonságát meghatároztuk (sta és stb enterotoxin gének szoros kapcsolata - toxin specifikus lókuszt: TSLpTC, plazmidkódolt patogenitási sziget: PAI I2173). A pTC plazmid replikációs origóját hordozó pPFE1 plazmid szekvencia-analízise során kiderült, hogy colE1 típusú. Azonban a replikációs origót követő, plazmid replikáció szabályozásáért felelős rom régiójában egy kb. 400 bp-nyi deléción van. Szegregációs kísérletek során vizsgáltuk a pTC plazmid valamint pPFE2 jelű származékának stabilitását (fennmaradási képességét) más colE1 típusú origót hordozó plazmidokkal összehasonlítva. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a pTC plazmid módosult colE1 replikációs origója felelős a pTC plazmid fennmaradásáért, alacsony szegregációs gyakoriságért. Ez a colE1pTC origó az Ec2173 törzs plazmidháztartását szabályozó rendszer fontos része lehet. A pTC plazmid konjugációs képességét feltehetően a replikációs origót követő mobilizációs (mob) régió határozza meg. Elvégeztük több, a választott malacok hasmenését vagy ödémabetegségét okozó F18+ E. coli törzs között az Ec2173 F18 fimbria plazmidjának replikontipizálását is, melynek során azt colE1-től eltérő, de hasonló replikációs kontrollmechanizmust alkalmazó F inkompatibilitási komplexbe tartozónak találtuk. Konjugációval sikerült izolálni a fimbriatermelésért felelős pF18 plazmidot. E plazmidon minden jel szerint ugyancsak egy sajátos virulencia géncsoport előfordulásával kell számolnunk, melynek részletes tanulmányozása a közeli terveink között van. Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy az F18+ ETEC törzsek sajátosságosan stabil plazmid háztartással rendelkeznek, melyhez virulencia plazmidjaik (és plazmidjaikon hordozott patogenitási szigetek) valamint a tetraciklin rezisztencia átadási készsége járul. A munka az OTKA T025729 és T034970 sz. kutatások keretében folyt.

FERENCZI EMŐKE¹, BAKONYI TAMÁS², MITTLERNÉ TÓTH ETELKA¹, CZEGLÉDI ALÍZ³, BÁN ENIKŐ¹

Egy régi-új vírus feltűnése: hazai Nyugat-nílusi láz fertőzések idegrendszeri tünetekkel, 2003-2004

¹Johan Béla OEK Virologiai Főosztály; ²SZIE Állatorvos-tudományi Kar Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék;

³MTA Állatorvostudományi Kutatóintézet, Budapest

A *Flaviviridae* család *Flavivirus* nemzetségébe számos emberi kórokozó tartozik, közülük Közép-Európában meghatározott földrajzi területeken a kullancsencephalitis endémiás. Bár több évtizede ismert, hogy hazánkban egy másik flavivirus, a West Nile (WN) vírus is előfordul, sem enzootikus, sem epizootikus megjelenését nem tapasztalták.

A 'Johan Béla' Országos Epidemiológiai Központ (OEK) (korábban Országos Közegészségügyi Intézet) Vírusdiagnosztikai Osztályán 1958 óta rendszeresen vizsgálják a kullancsencephalitis vírus (KEV) kórokozó szerepét akut idegrendszeri tüneteket mutató betegeknél. 1981 óta a szerológiai diagnosztika elsődleges módszere az indirekt immunfluoreszcens (IIF) vizsgálat saját készítésű antigéneken, mind IgG, mind IgM osztályú ellenanyagokra. 2003. augusztusában több betegből származó vérsavó alacsony hígításban reagált a KEV antigénnel, azaz IgG osztályú ellenanyag kimutatható volt, IgM azonban nem. A nemzetségen belüli szerológiai keresztreakciók okán felvetődött más flavivirus lehetséges kóroki szerepe. Noha a szerológiai vizsgálatok (haemagglutináció gátlás) alapján nem tartoznak azonos antigén csoportba, korábbi ismereteink és az igen meleg nyár, valamint az augusztusi megjelenés alapján mégis elsősorban a West Nile vírus jött számításba. Az 1972-ben elsőnek izolált hazai WN vírussal fertőzött Vero sejteken IIF módszerrel elvégzett vizsgálatok eredményei 14 betegnél bizonyították a WN vírus kórokozó szerepét azzal, hogy igen magas titerű (legtöbbször ≥ 1280) IgG mellett specifikus IgM is kimutatható volt. Néhány mintában vírusneutralizációval erősítettük meg az IIF eredményeket. A liquor mintákból – megegyezően az irodalmi adatokkal - egyetlen esetben sem sikerült RT-PCR segítségével a vírus jelenlétét bizonyítani.

A megbetegedések 2003. augusztus és október eleje között, sporadikusan fordultak elő, az ország olyan területein, melyek nem KE endémiásak. 2004 áprilisától július végéig 3 sporadikus esetet diagnosztizáltunk, közülük egy Izraelből importált. A 17 beteg közül 11-nél aseptikus meningitis, négyenél (egyik az importált) encephalitis volt a klinikai diagnózis, utóbbiakból egy személynél paresis is társult a tünetekhez. Halálozás nem fordult elő. Két személy viszonylag enyhe lázas megbetegedésben szenvedett, egyiküknek kiütései is voltak.

Az emberi megbetegedésekkel egyidőben egy lúdfarmon idegrendszeri tünetekkel járó és számos

elhulláshoz vezető járvány tört ki. A tünetek és kórszöveti vizsgálatok eredményei valószínűsítették a WN vírus lehetséges kóroki szerepét. 41 lúd 46 savómintája került vizsgálatra az OEK Vírusdiagnosztikai Osztályán WN vírus specifikus ellenanyagra, 1 kivétellel pozitív eredménnyel. Az elhullott ludakból RT-PCR segítségével a WN vírus nukleinsavát lehetett kimutatni, valamint a kórszöveti metszeteken végzett immunhisztokémiai vizsgálatok is igazolták a vírusfertőzést.

További vizsgálatokat igényel, hogy: 1., a WN vírus endémiássá válik-e Magyarországon; 2., eléri-e azokat a területeket, ahol a KEV endémiás; 3., mi a következménye az egymást követő két vírusfertőzésnek, KE oltásnak (védettség?, ellenanyag függő fertőzés fokozódás?); 4., a megelőzésre mely intézkedések, eszközök a legalkalmasabbak

FORGÁCH PETRA¹, TAPASZTI ZSUZSANNA¹, BAKONYI TAMÁS¹, KÖVÁGÓ CSABA¹, CSABA GYÖRGY², RUSVAI MIKLÓS¹

Survey on the occurrence of bee viruses in Hungary

¹Szent István University Faculty of Veterinary Science Department of Microbiology and Infectious Diseases;

²State Veterinary Institute, Budapest

A mézelő méh (*Apis mellifera* L.) fertőző betegségeit baktériumok, gombák és vírusok okozzák. A méhekben a vírusfertőzések hosszú ideig tünetmentesek maradhatnak, azonban egyes környezeti tényezők (hideg, zsúfoltság) és paraziták gyengítő hatásainak következtében olykor jellemző tünetekben, általában azonban a családok hirtelen összeomlásában nyilvánulnak meg, és ezzel jelentős gazdasági károkat idéznek elő.

Az elmúlt években a kutatók érdeklődése a méheket megbetegítő vírusok felé fordult. A vizsgálatok eredményeiből egyre többet tudunk a mézelő méhből eddig kimutatott 18 vírus biológiai és epidemiológiai tulajdonságairól. A részletes genetikai vizsgálatot is lehetővé tevő polimeráz láncreakció (PCR) alkalmazásával az állományokat tünetmentesen fertőző vírusok jelenlétének felderítése is könnyebbé vált.

Kutatócsoportunk 1999 és 2004 között 68 magyarországi méhészetben, PCR alkalmazásával végzett méhpatogén vírusok jelenlétére irányuló diagnosztikai vizsgálatokat. A felmérés során a génbankban elhelyezett teljes és részletes nukleotid-szekvenciák alapján tervezett specifikus primerek használatával hat vírus jelenlétét kutattuk. A heveny méhbénulás vírus (Acute Bee Paralysis Virus, ABPV) és a deformált szárny vírus (Deformed Wing Virus, DWV) magyarországi jelenlétéről méhmintákban és *Varroa destructor* atkákban már korábban beszámoltunk. További két vírus, a költéstömlősödés vírusa (Sacbrood Virus, SBV) és a fekete anyabölcső vírus (Black Queen Cell Virus, BQCV) hazai előfordulásáról most első ízben szeretnénk beszámolni. A Kasmír vírus (Kashmir Bee Virus, KBV) és a krónikus méhbénulás vírusa (Chronic Bee Paralysis Virus, CBPV) jelenlétét a felmérésben résztvevő méhészetekben nem észleltük.

A CBPV jelenlétére irányuló PCR vizsgálatok során két méhészetből érkező minta esetében a várt nagyságú terméknél kisebb ampikon képződött. A termékek szekvenciája 95%-os hasonlóságot mutatott a génbankban elhelyezett Rhopalosiphum padi vírus (RhpV) szekvenciákkal. Jelenlegi ismereteink szerint ez a vírus csak a zablevéltetűt (*Rhopalosiphum padi* L.) képes fertőzni. Előadásunkban a méhminták kontaminációja vagy az esetleges fertőzés felderítésére vonatkozó részletes vizsgálatainkat is szeretnénk ismertetni.

Infectious diseases of the honey bee (*Apis mellifera* L.) can be caused by bacteria, fungi, and viruses as well. The viral infections of bees may remain inapparent for a long period of time, but due to certain environmental factors (i.e. cold, crowded conditions) and weakening effects of parasites, sometimes they lead to typical symptoms of the disease. Even more frequently, the consequence of virus infection is sudden collapse of the colony, which, hence can cause considerable economic losses in beekeeping.

In the last few years the scientific interest turned towards the bee pathogen viruses. The results of the recent investigations revealed more and more details of the biological and epidemiological properties of some of the 18 viruses detected in the honey bee so far. The genetic characterization of certain viruses made the polymerase chain reaction (PCR) applicable for diagnostic submissions, and hence the detection of inapparent virus infections in bee colonies became easier.

By the use of PCR, we performed a survey on the presence of bee pathogen viruses in samples collected

from 68 Hungarian apiaries between 1999 and 2004. Based on the complete and partial genome sequences deposited in the GenBank database, we designed specific oligonucleotide primer pairs for the detection of six bee viruses in the country. The occurrence of the Acute Bee Paralysis Virus (ABPV) and the Deformed Wing Virus (DWV) in Hungarian bee samples and *Varroa destructor* mites has been published earlier. Recently we have found the Sacbrood Virus (SBV) and the Black Queen Cell Virus (BQCV) in our samples, so this is the first report on the occurrence of these viruses in the country. Kashmir Bee Virus (KBV) and Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) were not detected in the samples tested so far.

During the PCR investigations for CBPV, from the samples of two apiaries, a shorter amplicon was formed in the reactions. The nucleotide sequence of the product has shown 95% identity with the genome sequence of the Rhopalosiphum padi Virus (RhPV) deposited in the GenBank database. Up to our current knowledge, this virus is specific to the bird cherry - oat aphid (*Rhopalosiphum padi* L.). We would also like to present the results of our latest investigations, to reveal whether the presence of RhPV is the consequence of mere contamination, or the virus is able to infect and multiply in the honey bee.

FRÁTER TAMÁS, VISZLAY RENÁTA, BÉLAFINÉ BAKÓ KATALIN, GUBICZA LÁSZLÓ
Enzimkatalitikus észterezés ionos folyadékban – a keletkező víz eltávolítása pervaporációval
VE Műszaki Kémiai Kutatóintézet, Veszprém

Napjainkban a környezetbarát, tisztább termelés igénye jelentősen befolyásolja a gyógyszeriparban, illetve finomkémiaiában alkalmazott oldószerek megválasztását. Az erősen párolgó, gyakran toxikus és tűzveszélyes szerves oldószerek egyik lehetséges alternatívái az úgynevezett ionos folyadékok. Ezek a sószerű vegyületek nagyméretű szerves kationból (pl. alkilszubsztituált ammónium vagy imidazolium), illetve anionból (pl. tetrafluoro-borát, hexafluoro-foszfát) állnak. A nagy méret következtében a az ionok közötti elektrosztatikus kölcsönhatás olyan kicsi, hogy szobahőmérsékleten nem alakul ki kristályszerkezet, tehát ezek a sók normál állapotban folyékony halmazállapotúak. Az ionos folyadékok számos igen kedvező tulajdonsággal rendelkeznek, melyek közül a legfontosabb, hogy igen alacsony a gőznyomásuk, így a környezetterhelés, a tűzveszély és az anyagvesztés is minimális. További fontos előnyük, hogy nagy a hőmérsékleti stabilitásuk, valamint a kation és az anion megfelelő módosításával széles körben variálhatók bizonyos tulajdonságaik, mint polaritás, hidrofób jelleg valamint más oldószerekkel való elegyedés. Ezen utóbbi tulajdonságuk alapján az ionos folyadékok egy adott célra „tervezhetőek”. Kutatóintézetünkben közel két évtizede foglalkozunk természetes aromaészterek biotechnológiai előállításával, ezen belül különböző alkoholok rövid szénláncú savakkal történő enzimatikusan észterezésével. A legnagyobb kihívást az etil-acetát előállítása jelenti az ecetsav és az etanol erős inhibeáló hatása miatt. Az észterezési reakciókban *Candida antarctica* lipázt alkalmaztunk különböző reakcióközegekben. Az észterezést szerves oldószerben, n-hexánban, [bmim]PF₆ ionos folyadékban valamint oldószer mentes rendszerben, alkohol feleslegben elvégezve azt tapasztaltuk, hogy az aktiválási energia az ionos folyadékban a legalacsonyabb. A következő lépésben az egyensúlyt úgy kívántuk az észterképződés felé eltolni, hogy a keletkező vizet pervaporációval folyamatosan eltávolítottuk. Előadásunkban összehasonlítjuk a három különböző módszer előnyeit és hátrányait, valamint bemutatjuk kísérleti eredményeinket, amelyek igazolják az integrált rendszer alkalmazásának szükségességét a konverzió növelése és a reakcióelegy feldolgozása szempontjából.

A szerzők megköszönik az OTKA T 037628 számon nyújtott támogatását.

GALGÓCZY LÁSZLÓ¹, PÓCSI ISTVÁN², LEITER ÉVA², PAPP TAMÁS¹, VÁGVÖLGYI CSABA
***Penicillium chrysogenum* antifungális fehérje hatása járomspórás gombákra**

¹SZTE TTK Mikrobiológiai Tanszék, Szeged; ²DE TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék, Debrecen

A *Penicillium chrysogenum* nagy mennyiségben választ ki környezetébe egy erősen bázikus, ciszteinben gazdag kis molekulatömegű fehérjét, mely képes gátolni számos fonalas gomba növekedését. A gátló hatás megmutatkozhat a konídiumképzésben, a hifa növekedésében és a spórák csírázásában.

A *P. chrysogenum* antifungális fehérje (PAF) járomspórás gombákra gyakorolt hatását átfogóan még

nem vizsgálták. Kísérleteink során 23 járomspórás gomba PAF érzékenységét teszteltük. A vizsgálatba bevont törzsek 16 különböző nemzetséget képviseltek, melyek tagjai között több fajt humán és állati mikózisok kórokozójaként is számon tartanak (*Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus*, *Micromucor ramanniana*, *Mortierella wolfii*, *Mortierella elongata*, *Mortierella nanthalensis*, *Mucor racemosus*, *Mucor hiemalis*, *Actinomucor elegans*, *Backusella ctenidia*, *Backusella lamprospora*, *Thamnostylum piriforme*, *Gilbertella persicaria*, *Syncephalastrum racemosum*, *Umbellopsis isabellina* *Zygorynchus macrocarpus*, *Mycotypha africana*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus microsporus*, *Saksanea vasiformis*, *Cokeromyces recurvatus*, *Absidia corymbifera*). Kontrollként *Aspergillus niger* (PAF szenzitív) és *Aspergillus terreus* (PAF inszenzitív) törzseket használtunk. A PAF hifanövekedésre és a spórák csírázására gyakorolt hatását különböző táptalajokon vizsgáltuk az 1-50 µg/ml koncentráció tartományban. A növekedésgátlás meghatározása agardiffúziós technikával történt.

Eredményeink több faj esetében (*M. wolfii*, *M. elongata*, *M. nanthalensis*, *M. ramanniana*, *U. isabellina*, *M. africana*, *R. microsporus*, *Z. macrocarpus*, *A. coyimbifera*) a PAF gátló hatását jelezték, mind a hifák növekedésére, mind a spórák csírázására. Gyengébb gátló hatást tapasztaltunk a *R. pusillus*, *R. miehei*, *B. ctenidia*, *B. lamprospora*, *T. piriforme* és a *R. oryzae* esetében. Nem volt kimutatható gátló hatás a *M. racemosus*, *M. hiemalis*, *A. elegans*, *G. persicaria*, *S. racemosum*, *R. stolonifer*, *S. vasiformis* és a *C. recurvatus* törzseknél. A gátlás erőssége függött az alkalmazott tápközegtől is (a legnagyobb gátló értékeket minimál táptalajon mértük, míg a malátáson nem hatott a PAF). A PAF és a hasonló antifungális fehérjék jelentősek lehetnek különböző jövőbeli gyakorlati alkalmazásokban.

A kutatást az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA F046658 és T037471) támogatta.

GERMÁN PÉTER, KECSKEMÉTI SÁNDOR, KISS ISTVÁN

Multiplex PCR rendszerek diagnosztikai célú kifejlesztése baromfiállományok kórokozó profiljának jellemzésére

Debreceni Állategészségügyi Intézet Molekuláris Diagnosztikai Részleg, Debrecen

A nagy létszámú baromfiállományokban jelentkező és súlyos gazdasági károkat előidéző fertőző tünetegyüttesek hátterében sok esetben számos kórokozó egyidejű előfordulása és kártétele húzódik meg. A gyors diagnózis felállítását megkönnyítik azok a diagnosztikai eszközök, amelyek több kórokozóról egyidejűleg szolgáltatnak információt. Az ilyen diagnosztikai rendszerek kialakítását egy részről gyakorlati-technikai szempontok, másrésztől ráfordított költség- és munkaidő megtakarítási irányelvek is motiválják. A fenti célok elérése érdekében az egyik legalkalmasabb megközelítést a nukleinsav alapú molekuláris biológiai módszerek, ezek közül is a polimeráz láncreakció (PCR) biztosítja. A baromfi légzőszervi kórokozói közül az avian pneumovirusra (APV), a baromfipestis vírusára (NDV), a csirkék fertőző bronchitis vírusára (IBV), a baromfi fertőző gége- és légcsőgyulladást okozó (laryngotracheitis) vírusára (ILTV), továbbá a fontosabb, baromfit fertőző *Mycoplasma* fajokra és az *Ornithobacterium rhinotracheale* kimutatására fejlesztettünk ki multiplex PCR rendszereket. Az eljárásokat technikai alapon választottunk szét az RNS genommal rendelkező APV-, NDV-, IBV-kimutató, valamint a DNS genommal rendelkező *Mycoplasma*, *Ornithobacterium* és ILTV specifikus multiplex PCR rendszerekre. Jelen beszámolómban az RNS és a DNS alapú általános rendszer mellett az APV, illetve az IBV szerotípus differenciáló multiplex RT-PCR rendszerek beállítását és alkalmazását szeretnénk bemutatni. Az optimalizálási munkálatok magukba foglalják a multiplex PCR rendszer specifikitásának, valamint érzékenységének a meghatározását. Az analitikai érzékenység meghatározásához a PCR termékeket plazmidba klónoztuk, majd a tisztított plazmidok tízes léptékű hígításával – ismerve a kiindulási plazmid kópia számát — állapítottuk meg a primerek érzékenységét real-time PCR segítségével is. A biológiai érzékenység (TCID₅₀, EID₅₀) megadásához a kórokozók titrált mennyiségének tízes léptékű hígítási sorát használtuk fel a vizsgálatainkhoz. A real-time PCR-os méréseinket a kettős szálú nukleinsav fragmentekhez interkaláló SYBR-Green fluorescens festék felhasználásával végeztük, amely eljárás során szintén lehetőségünk volt a fragmentek specifikitásának a visszaellenőrzésére is olvadás pontjuk meghatározása révén. Az olvadáspont meghatározás számos esetben jó lehetőséget biztosít az egyes variánsok elkülönítésére is, mert a PCR termékeknek ez a jellemzője a nukleotidsorrendjüktől és a másodlagos struktúrájuktól függ. Így ugyanazzal a primer párral szintetizált, ugyanolyan méretű PCR termékek között különbséget lehet tenni az olvadáspont analízissel anélkül, hogy a reakcióelegyet tartalmazó csövet/kapillárist ki kellene nyitnunk, jelentősen csökkentve ezáltal a kontamináció

veszélyét.

A rendszer alkalmazásával gyors és hatékony információt nyerhetünk a vizsgált állomány kórokozó profiljáról. Ezt elősegíti az is, hogy a módszer érzékenysége miatt egy reakcióban egy állomány több egyedéből származó mintát is tesztelhetünk. A további fejlesztések az újabb típusok felismerésére, virulencia változatok elkülönítésére, valamint a vakcina-vadvírus elkülönítésére irányulnak.

GERMÁN PÉTER¹, URSU KRISZTINA², MARISA ARIAS³, KISS ISTVÁN¹, BELÁK SÁNDOR⁴,
ÄSE UTTENTHAL⁵

Afrikai sertéspestis vírus kimutató fret-alapú primer és próba jelölt kvantitatív (real-time) PCR rendszer adaptálása bioradicycler készülékre

¹Debreceni Állategészségügyi Intézet Molekuláris Diagnosztikai Részleg, Debrecen; ²Országos Állategészségügyi Intézet, Szerológia Osztály, Budapest; ³Centro De Investigation en Sanidad Animal, Madrid, Espana; ⁴National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden; ⁵Danish Veterinary Institute, Lindholm, Denmark

Jelen beszámolónk egy újszerű, az Afrikai Sertéspestis vírus (ASFV) specifikus kimutatására alkalmas diagnosztikai eszköz kialakítását foglalja magába, amit a QLK2-CT-2000-00486 projekt számú EU 5. keretprogramban valósítottunk meg (<http://www.multiplex-eu.org>). Äse Uttenthal⁵ és munkacsoportja fejlesztette tovább a Nemzetközi Állatjárványügyi Hivatal (OIE Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccine) ajánlásában szereplő általános ASFV specifikus PCR diagnosztikai rendszert kvantitatív real-time-PCR módszerre. Munkánk során ezen technika BIO-RAD iCycler készülékre történő adaptálásának tapasztalatait szeretnénk bemutatni. Ezt a fluoreszcens rezonancia energia transzferen (FRET) alapuló real-time PCR módszert, --amely egy FAM fluoreszcens festékkel 5' végen jelölt primerre és Texas-Red fluoreszcens festékkel 3' végen jelölt próbára épül -- a dán kollaborációs partner fejlesztési tevékenysége során sikeresen optimalizálta ABI-PRISM real-time PCR készülékre. A két készülék detektálási rendszerének eltérése miatt a fluoreszcens donor és acceptor festékek orientációját közelebb helyeztük egymáshoz, hogy elérjük a megkívánt érzékenységet az iCycler-en is. A módosított FRET alapú próba rendszerrel elvégeztük a specifitás vizsgálatokat nyolc különböző vírus törzsön és az érzékenység meghatározásokat ismert titerű (UHAD50) vírus izolátumon. A vírus tenyészetekből és a klinikai izolátumokból származó kivont nukleinsav mintákat a spanyol kollaborációs partner bocsájtotta a rendelkezésünkre. A módszer mennyiségi meghatározások mellett a termékre specifikus próba olvadáspontjának a mérése révén képes növelni a diagnosztikai eredmény megbízhatóságát is. Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a FRET alapú real-time PCR módszer sikeresen adaptálható volt a BIO-RAD iCycler készülékre is. A módszert diagnosztikai célokra való felhasználását ígéretesnek látjuk nagyfokú megbízhatósága és érzékenysége miatt a betegséggel érintett területeken.

GHIDÁN ÁGOSTON, PESTI JÓZSEFNÉ, KRISTÓF KATALIN, ROZGONYI FERENC

Klinikai mintákból kitenyészett enterococcusok antibiotikum rezisztenciája

Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Budapest

Az enterococcusok egyre gyakrabban tenyésznek ki klinikai mintákból. Vizsgáltuk a Semmelweis Egyetem, az Országos Gyógyintézeti Központ és az esztergomi Vaszary Kolos Kórház-Rendelőintézet betegeinek klinikai vizsgálati anyagaiból (a széklet kivételével) 2001-2003 között kitenyészett enterococcusok gyakoriságát, faji megoszlását és véletlenszerűen kiválasztott törzsek antibiotikum érzékenységét. 2001-ben 8,7%-ban (n=1156) tenyészett ki *Enterococcus* sp. Ez 2002-ben már 11,8%-ra (n=2183) növekedett és 2003-ban 16,4%-ot (n=3728) ért el. A leggyakoribb species az *Enterococcus faecalis* (98,5%), *E. faecium* (0,8%) és *E. gallinarum* (0,3%) voltak. Vizsgálatunk során 128 *E. faecalis* törzset gyűjtöttünk össze véletlenszerűen. Ezen törzsek érzékenységét mikrodilúcióval is megvizsgáltuk az NCCLS szerint: penicillin, gentamicin, ciprofloxacín, levofloxacín, tetracyclin, nitrofurantoin, teicoplanin és vancomycin iránt.

Eredmények:

β-laktamázt termelő törzsek viszonylag ritkán fordultak elő a fent említett betegellátó intézmények pácienseiből kitenyészett enterococcusok között. A quinolonok közül a ciprofloxacinnal szembeni

rezisztencia gyakoribb, mint a levofloxaccinnal szembeni. A nitrofurantoin iránti igen gyakori érzékenység a ritka alkalmazással és a szer speciális hatásmechanizmusával magyarázható. A glycopeptid rezisztencia Magyarországon nagyon ritka, az általunk vizsgált mintákból még nem sikerült izolálnunk rezisztens törzseket.

Antibiotikum	Érzékeny, %	Mérsékelt, %	Rezisztens, %
Penicillin (n=128)	97,6 (MIC < 8 µg/ml)	----	2,3 (MIC > 13 µg/ml)
Gentamicin (n=90)	71,1 (MIC < 500 µg/ml)	----	28,8 (MIC > 500 µg/ml)
Ciprofloxacin (n=128)	10,9 (MIC < 1 µg/ml)	32 (MIC 2 µg/ml)	57 (MIC > 4 µg/ml)
Levofloxacin (n=123)	48,7 (MIC < 2 µg/ml)	4,9 (MIC 4 µg/ml)	46,3 (MIC > 8 µg/ml)
Tetracycline (n=127)	5,5 (MIC < 4 µg/ml)	0 (MIC > 8 µg/ml)	94,5 (MIC > 16 µg/ml)
Nitrofurantoin (n=126)	86,5 (MIC < 32 µg/ml)	7,9 (MIC 64 µg/ml)	5,5 (MIC > 128 µg/ml)
Teicoplanin (n=128)	100 (MIC < 8 µg/ml)	0 (MIC 16 µg/ml)	0 (MIC > 32 µg/ml)
Vancomycin (n=128)	100 (MIC < 4 µg/ml)	0 (MIC 16 µg/ml)	0 (MIC > 32 µg/ml)

GÖNCZÖL ÉVA

A *Chlamydia pneumoniae* szerepe az atherosclerosis pathogenezisében

Johan Béla OEK Virologiai Főosztály, Budapest

Chlamydia pneumoniae (Cpn) baktérium DNS vagy antigén gyakran kimutatható az atherosclerotikus (AT) plakkok sejtjeiben, de nem mutatható ki, vagy csak nagyon ritkán, egészséges artéria szakaszokban. Továbbá, seroepidemiológiai vizsgálatok, kísérleti állatmodellek adatai és in vitro kísérletek eredményei megerősítik azt a hipotézist, hogy az AT bizonyos formái kapcsolatba hozhatók Cpn fertőzéssel. A Cpn fertőzés bizonyos jellegzetességei megvilágíthatják a Cpn fertőzés és AT kialakulás kapcsolatának mechanizmusát. Ezek a jellegzetességek a következők: (1) Krónikus Cpn fertőzések, amelyekre életképes, de nem kitenyészhető stádiumban lévő baktériumok jelenléte jellemző. Cpn perzisztencia rendszerek in vitro kialakítása a fertőzött kultúrák antibiotikum vagy cytokin, elsősorban IFN-gamma, kezelésével, vagy tápanyagok, különösen triptofán elvonásával, vagy monocyta kultúrák fertőzésével, vagy a fertőzött kultúrák folyamatos fenntartásával lehetséges. A Cpn perzisztenciát in vivo megváltozott morfológiájú Cpn zárványok, Cpn makromolekulák kimutathatósága és a fertőzés reaktivációja jellemzik (Hogan RJ. 2004). (2) A gazdasejtek megváltozott génexpressziója Cpn fertőzés hatására. Fertőzött endothél sejteken a vizsgált 268 sejtű gén közül 20 gén fokozott kifejeződését írták le, amelyek különböző cytokinek, chemokinek, növekedési faktorok és adhéziós molekulák kódolásáért felelősek (Coombes BK, 2001). Az U937 monocyta sejtvonal Cpn fertőzése a vizsgált 2000 gén közül 128 gén expresszióját változtatta meg, ezen gének termékei a DNS és RNS metabolizmussal, sejt-ciklus regulációval vannak kapcsolatban. Igen érdekes, hogy olyan gének fokozott kifejeződése is bekövetkezett, amelyek az AT progressziójához szorosan kapcsolódnak, így a lipid felhalmozódásban, vasoconstrictióban és coagulációban van szerepük (Virok D. 2003). Fertőzött egerek tüdejében a hisztidin dekarboxiláz enzim fokozott kifejeződését írták le, amely fokozott hisztamin termelést eredményezhet és a Cpn fertőzés okozta gyulladások egyik jellemzője lehet (Burian K. 2003). (3) A perzisztens Cpn fertőzések és hHSP60 ellenanyagok magas szintje közötti szinergikus hatások, valamint más patogénekkal lezajlott fertőzésekkel való kölcsönhatások. Lényegesen magasabb rizikót jelent a coronaria megbetegedés súlyosságára a magas Cpn és magas hHSP60 ellenanyag szintek együttes jelenléte, és előzetes cytomegalovírus fertőzés predisponáló tényező lehet az AT lézió kialakulására (Burian K. 2001). (4) A Cpn fogékonyságot befolyásoló gazda genetikai tényezők, pl. a mannóz kötő lektin gén polimorfizmusa (Rugonfalvi-Kiss Sz. 2002), vagy a monocyta LPS receptor (CD14) gén promoter polimorfizmusa (Eng HL. 2003). (5) A Cpn genom genetikai különbségei, amelyek kapcsolatban lehetnek a baktérium vasculáris tropizmusával és pathogenitásával. A tirozin/triptofán permeáz gén (tyrP) különbségét figyelték meg a vasculáris és légúti törzsek genomjában; a légúti törzsek genomjában több kópiában, míg az érrendszeri eredetű törzsek genomjában csak egy kópiában van jelen a tyrP gén. Feltételezik, hogy ez a genetikai különbség az érrendszeri törzsek fokozott perzisztenciáját okozza (Gieffers J. 2003).

GRÓSZ GÁBOR¹, SIRÁK KISZTINA¹, JOHN H DOONAN², FEHÉR ZIGMOND¹

***Neurospora* protein-foszfataz gének heterológ expressziójának vizsgálata *Aspergillus nidulans*-ban**

¹DE OEC Humán-genetikai Intézet, ²John Innes Centre Department of Cell & Developmental Biology, Norwich, UK

Munkacsoportunk két Ser/Thr-specifikus protein-foszfatazzal foglalkozik *Neurospora crassa*-ban. A *ppp-1* az 1-es típusú Ser/Thr protein-foszfataz (Ppp-1) katalitikus alegységét kódolja. A *pzl-1* által kódolt új típusú protein-foszfataz katalitikus doménje nagy homológiát mutat a Ppp-1-gyel. A közeli rokon, ugyancsak fonalas ascomyceták közé tartozó *Aspergillus*-ban az 1-es típusú foszfataz katalitikus alegységét a *BIMG* kódolja.

Dr. John Doonannal (Norwich, Anglia) kooperációban végzett kísérleteink egyik célja annak igazolása, hogy a Ppp-1 a BimG-protein funkcionális homológja, azaz az előbbivel lehetséges-e komplementálni az utóbbi hiányát. A Ppp-1 és Pzl-1 proteinek közti homológiából ugyancsak következhet egy funkcionális felcserélhetőség, vagyis komplementáció (bár erre kisebb az esély). Kérdéseink megválaszolásához a fehérjék cDNS- -eit *Aspergillus*-ban működő expressziós vektorba (pAL3X) klónoztuk a Gateway-rendszer segítségével, majd transzformáltuk *bimG*-mutáns (JHD004) és vad típusú (GR5) törzsekbe. A transzformánsokkal elvégzett komplementációs kísérletek eredménye meglepő volt: úgy tűnik, nincs komplementáció. Későbbiekben a megállapítás helyességét szeretnénk igazolni a génextpresszió detektálásával, azaz kimutatni, hogy a komplementáció hiánya nem a sikertelen expresszióknak tulajdonítható-e.

Vizsgálataink másik célja a Ppp-1 és Pzl-1 proteinek lokalizációjának meghatározása GFP-fúzió segítségével. A BimG-GFP fúziós protein a nucleolus, az SPB, a hifacsúcs és a szeptum területére lokalizálódik. A Ppp-1 és Pzl-1 lokalizációja mindeztidáig ismeretlen. Ezen kísérleteinkben felhasznált plazmidok lényegében csak a GFP-fragmentum tekintetében tértek el a korábbi konstrukcióktól. A vizsgált gének mindkét végére terveztünk GFP-fúziót, nem tudván, valójában melyik fog működni. Sikertelen kimutatnunk a Pzl-1-GFP termék expresszióját, amely a sejt-mag környezetében, feltehetően az endoplazmatikus retikulum területén detektálható. A pontosítás további citológiai vizsgálatot igényel.

A magyar-brit tudományos együttműködést az OM Tét Alapítvány támogatta (GB51/01).

GYETVAI ÁGNES, LENKEY BÉLA

A metilprednizolon hatása a *Candida albicans* virulenciájára

DE Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék, Debrecen

A kortikoszteroidokat gyulladáscsökkentő és immunszuppresszív hatásuk miatt széleskörűen alkalmazzák a gyógyászatban. A kortikoszteroid terápiában részesülő betegek körében magasabb számban alakulnak ki gombás fertőzések. Emiatt azonban a szteroid terápiával párhuzamosan gyakran alkalmaznak antifungális szereket, rendszerint flukonazolt. A kortikoszteroidok mikrobákra gyakorolt hatásáról, valamint az antifungális szerek és a kortikoszteroidok interakciójáról kevés adat áll rendelkezésünkre.

Vizsgálatainkban tanulmányoztuk, hogy a klinikai gyakorlatban széleskörűen alkalmazott metilprednizolon hogyan hat a *C. albicans* élesztőgomba növekedésére, csírázási és adhéziós képességére, valamint az extracelluláris hidrolitikus enzimek (aszpartát proteáz és foszfolipáz) termelésére. Megvizsgáltuk, hogy az élesztősejtekben kimutatható-e a metilprednizolon. Választ kerestünk továbbá arra a kérdésre, hogy ezen szteroid befolyásolja-e a flukonazol, illetve egy másik szteroid-bioszintézist gátló szer, a lovasztatin antifungális hatását.

Metilprednizolon (2 mg/ml) jelenlétében nagyobb volt a *C. albicans* növekedési rátája, biomassza termelése. Ezen szteroid a növekedés 24. órájára átlagosan 11%-kal serkentette a gomba növekedését. Az élesztősejtekben sikerült kimutatni a metilprednizolon jelenlétét HPLC segítségével. A metilprednizolon a flukonazol növekedésgátló hatását nem befolyásolta, míg a lovasztatin – ami a szterol bioszintézis egy korábbi lépését gátolja – növekedésre kifejtett gátló hatása 18 %-kal csökkent a szteroid jelenlétében. A szteroid jelenlétében előinkubált sejtek birka szérumban való csírázási képessége jelentős mértékben nőtt (31%). A szteroiddal kezelt és kezeletlen sejtek aszpartát proteáz termelésében nem találtunk szignifikáns különbséget. A szteroiddal előinkubált sejtek foszfolipáz

aktivitása viszont kismértékben, de szignifikánsan magasabbnak bizonyult a kontroll sejtekéhez képest. Vizsgálati körülményeink között a metilprednizolon nem befolyásolta a sejtek műanyag felszínéhez való tapadási képességét.

Eredményeink azt mutatják, hogy a metilprednizolon hatással van a *C. albicans* növekedésére és virulenciájára is. Feltehető, hogy a szteroid kezelés képes az élesztősejtek fiziológiájára hatva növelni a *C. albicans* által okozott megbetegedések kialakulásának esélyét.

HAJDÚ CSABA^{1,2}, SZARVAS JÓZSEF², BUJDOSÓ LÁSZLÓ²

Laskagomba fajok (*Pleurotus* spp.) nemesítési módszerei Magyarországon

¹BCE Zöldség- és Gombatermesztési Tanszék, Budapest; ²Quality Champignons Kft. Fajtakutató Laboratórium és Gombacsíra Üzem, Demjén

Hazánkban a laskagomba-termesztésnek és nemesítésnek komoly hagyományai vannak. Legnagyobb nemzetközi elismerést a GYURKÓ PÁL által kinemesített HK 35 hibrid vívta ki, amely fajta - leszármazottaival együtt - a világ nagy részén elterjedt. A Korona Gombacsíra Üzemben és Fajtakutató Laboratóriumban 1996-ban indult be egy nemesítési program, amelyben a gyors növekedést, korai termőtestképzést, magas hőmérsékleti optimumot és a csökkent spóraszámot használjuk szelekciós szempontként. Munkánk során sikerült olyan hibrideket előállítanunk, melyek néhány nappal korábban fordulnak termőre, mint az eddig használt fajták. Ezenkívül termesztési kísérleteket folytatunk olyan hibrid fajtákkal, melyek a termőtestképzés idején jól tűrik a 22–23 °C-ot is. Előadásomban e nemesítési eredményeket ismertetem.

A laskagomba-fajok (*Pleurotus*) nagyon közkedvelt, vadon élő és termesztett ehető gombák. Megtermelt mennyiségüket tekintve a világon a harmadik, hazánkban pedig a második helyen állnak. Ezen ízletes és egészséges fajok termesztése a jövőben világviszonylatban valószínűleg emelkedni fog. Ennek oka, hogy termesztésük nem igényel olyan komoly technikai háttérrel, gépparkot, mint a csiperketermesztés, továbbá – intenzív lignocellulóz-bontó képességükből kifolyólag – alkalmasak lehetnek olyan mezőgazdasági hulladékok hasznosítására, melyek eddig kihasználatlanok voltak.

Hazánkban a laskagomba-nemesítés egyidős a termesztéssel. Kezdetben hazai *P. ostreatus* és *pulmonarius* fajtákat szelektáltak és adaptáltak a termesztésben. Ez a szelekciós munka az első időkben kielégítő volt, melynek eredményeképpen több államilag minősített fajtát termesztettek. HELTAY Imre – TÓTH László – TÓTH Ernő – VÉSSEY Ede kutatók termesztéstechnológiai szabadalmi nagy lendületet adtak a termesztés fejlődésének. Ezt tovább fokozták GYURKÓ Pál hibridjei is. Az első államilag minősített H 7 hibrid átszövetési ideje már csak 3 hét volt, és 15–25 °C között is jól termett. A H 7 egy késői és a floridai laskagombák hibridje. Sorban azután következtek az újabb hibridek, mind jobb tulajdonságokkal és termesztési lehetőségekkel. A G 24, HK 44 és elsősorban a HK 35 fajták még ma, néhány évtized elteltével is kiváló fajták. A HK 35-ös hibridet a H 7 és egy Olaszországból származó késői laskagomba keresztezésével nyerte a nemesítő. E hibrid és különböző spórafelvételei, változatai meghódították az egész világot. (SZABÓ 1990., SZILI 1996.). Akár a HTTV-eljárásra, akár a GYURKÓ-hibridekre gondolva büszkén kijelenthetjük, hogy a nemzetközi szintű laskagomba-termesztés fellendüléséhez nagyban hozzájárultak a magyar szakemberek.

HAJDU KINGA, TÓTH ERIKA

Kosok wohlfahrtiosisának bakteriológiai vizsgálata

ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszék, Budapest

Hazánkban legtöbb esetben az obligát parazita életmódot folytató *Wohlfahrtia magnifica* (pettyes húslégy, Diptera: Sarcophagidae) felelős a legeltetett állatok, elsősorban juhok traumás myiasisáért (sebnyűvesség), mely komoly gazdasági és állategészségügyi problémákat vet fel. Preventív védekezési módszer kutatásához elengedhetetlen a bántalom mikrobiológiai háttérének ismerete. Kosok ilyen irányú vizsgálatára ezidáig nem került sor, holott, ha jelen vannak a nyájban, fertőződésük valószínűsége a jérékénél jóval nagyobb (74,3 % : 16,5 %). Vizsgálódásaink célja az egészséges és myiasisos kosok bőrfelületein élő aerob és fakultatív anaerob baktérium-közösségek feltérképezése, összehasonlítása volt. Kosok tasakjának egészséges és myiasisos hámfelületeit mintáztuk steril vattatamponok segítségével, az

egy mintából King B agaron aerob körülmények között növő kolóniákból nem szelektív módon baktériumtörzseket izoláltunk. A tisztítást követően a nedves tenyészetekből membránsírsavakat preparáltunk, ezeket HP 5890 gázkromatográf segítségével analizáltuk. A baktériumokat zsírsavprofiljuk alapján Syntax 2000 hierarchikus klasszifikációs programmal csoportosítottuk, majd a hasonlósági dendrogram csoport-reprezentánsait 16S rDNS szekvencia-analízisnek vetettük alá.

Megállapítottuk, hogy mindkét esetben Gram pozitív baktériumok kolonizálták dominánsan a hámfelületet. Az egészséges területen túlnyomóan obligát aerob, igen széles sótoleranciájú, többségében α -hemolizáló baktériumok fordulnak elő. A myiasisos terület mikrobaközösségében csökken a sótűrő taxonok mennyisége, és a β -hemolizálók nagyszámú előfordulása jellemző. Faji összetételét tekintve az egészséges hámfelületet egy igen változatos aktinobaktérium-közösség népesíti be (*Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Salinicoccus*, *Corynebacterium*, *Micromonospora*, *Brachybacterium*, *Rhodococcus*, *Williamsia*, *Nocardioides*), ám ezek gyakorisága és faji gazdagsága a fertőzés hatására visszaszorul, utat engedve egyéb mikroorganizmusok elszaporodásának. Így kosoknál nagy számban jelennek meg a tasak hámján fiziológiás körülmények között kis mennyiségben megtalálható, közönséges talajlakó baktériumok (pl. *Bacillus* spp). Az intakt hámon a *Streptococcus* nemzetség tagjai kommenzalista mikrobapartnerekként fordulnak elő, ám a bántalom során jelentősen elszaporodnak, hozzájárulva a lárvák távoztával a sebben induló gennyesedési folyamatokhoz. Sikerült olyan aktinobaktériumot kimutatni (*Rhodococcus opacus*), mely nemzetségéről irodalmi adatok igazolják a *Wohlfahrtia magnificára* kifejtett kemotaktikus vonzó hatását. Tapasztalatainkat ígéretes lenne a legyek eredményes legelői csapdázásának kikísérletezésében kamatoztatni. A szekvencia-analízisek során több olyan baktériumot találtunk, melyek hasonlósága az eddig ismert szekvenciákkal igen alacsony, ezen esetekben új taxonok (fajok, nemzetségek) leírása kezdődhet el.

HARCZ PÉTER¹, EMMANUEL K. TANGNI², PUSSEMIER LUC², VAN HOVE FRANCOIS³, KÖVICS GYÖRGY J¹.

Gliotoxintermelő *Trichoderma virens* törzsek fenológiai összehasonlítása RAPD PCR módszerrel

¹DE ATC Növényvédelmi Tanszék, Debrecen; ²Department of Quality and Safety, Veterinary and Agrochemical Research Centre, Tervuren; ³Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain, Belgium

Napjainkban széles körben alkalmaznak molekuláris biológiai módszereket gömbtörzsek elkülönítésére vagy összehasonlítására.

11 *Trichoderma virens* és negatív kontrollként 3 nem *T. virens* törzsből (*T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. hamatum*) izoláltunk DNS-t RAPD PCR reakció céljából.

A DNS kivonását a BCCMTM/MUCL laboratóriumában alkalmazott, standard eljárásokon alapuló módszer szerint végeztük. A DNS amplifikációja microplate-en történt. A fenológiai analízis az eljárás azon a feltételezésen alapult, hogy a véletlenszerűen kiválasztott primerek reprodukálhatóan képesek amplifikálni polimorfikus sávokat. A genetikai távolságmátrix értékei (1-F) a PHYLIP nevű programmal lettek számolva és kezelve, a súlyozatlan pár-csoportok módszerét felhasználva, számtani átlagot számolva (UPGMA).

A törzsek genetikai polimorfizmusának alátámasztására RAPD PCR analízist alkalmaztunk, hogy a véletlenszerűen összeállított primereket használva, az amplifikált sávok jelenlétét fenológiai analízissel értékeljük. A PCR amplifikáció analízisének eredményei összefüggést mutattak a gliotoxintermelés meglétével, a nem termelő izolátumnál ugyanakkor az RAPD PCR megközelítéssel nem tudtuk elkülöníteni a nagy mennyiségű gliotoxint termelő törzseket. A gliotoxin mennyisége nem korrelált a fenológiai analízis eredményeivel.

HARCZ PÉTER¹, TANGNI EMMANUEL K. ², PUSSEMIER LUC², VAN HOVE FRANCOIS³, KÖVICS GYÖRGY J¹.

***Trichoderma virens* törzsek gliotoxin termelése laboratóriumi fermentációs rendszerben és a termelt gliotoxin HPLC-s detektálása**

¹DE ATC Növényvédelmi Tanszék, Debrecen; ²Department of Quality and Safety Veterinary and Agrochemical Research Centre, Tervuren; ³Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain, Belgium

Ebben a munkában *Trichoderma* törzseket vizsgáltunk, hogy jobban megismerjük a gliotoxin termelésük sajátosságait, illetve, hogy áttekintsük a gliotoxint termelő gombák taxonómiai helyét a *Trichoderma* nemzetségen belül. 11 fajt (*T. harzianum* (17), *T. viride* (17), *T. longibrachiatum* (12), *T. virens* (11), *T. koningii* (10), *T. polysporum* (8), *T. hamatum* (6), *T. pseudokoningii* (6), *T. atroviride* (3), *T. aureoviride* (4), *T. flavofuscum* (1)) reprezentáló 96 *Trichoderma* törzset vizsgáltunk a gliotoxintermelésük szempontjából.

A toxin HPLC-vel történő detektálásához a mintákat a táplevesből vettük, majd ezek közvetlenül lettek a rendszerbe injektálva. A detektáláshoz használt rendszer paraméterei a következők voltak: (25:75 acetonitril:víz eluensként 1,0 ml min⁻¹ áramlási sebességgel, Waters 510 pumpa, WISP model 712 injektor, 270 nm hullámhosszra beállított detektor, ChromQuest 3.0 software. Chromsep SS (100 x 4,6 mm i.d., 3 µm alkotókkal) Microsphere C₁₈ oszlop a CP 28141 előszloppal, 35°C-on, 10 µl injektált mennyiség).

Szintetikus és komplex tápleveseket hasonlítottunk össze a táplevesben növekvő gomba gliotoxintermelése és szárazanyaggyarapodása szempontjából. Eredményeink azt mutatták, hogy a *T. virens* törzsek statisztikailag igazolhatóan intenzívebb micéliumnövekedést és magasabb gliotoxin-termelést mutattak a trofofázis ideje alatt 2%-os maláta táplevesben, mint szintetikusban. A nagy mennyiségű gliotoxint termelő törzsek esetében gliotoxin szintézise kezdetben a biomassza növekedésével párhuzamosan fokozódott, majd hirtelen lelassult.

Kilencvenhat, gliotoxin-termelő képesség céljából tesztelt *Trichoderma* törzsből mindösszesen tíz (10,4%) törzs esetében tapasztaltunk gliotoxin termelést folyadékkultúrában. A tíz törzs a *Trichoderma* (syn: *Gliocladium*) *virens* fajt képviselte, a törzsgyűjteményekben szereplő fajmeghatározás alapján.

Eredményeinkből azt a következtetést vontuk le, hogy a gliotoxin termelés a *T. virens* faj sajátossága, de ugyanakkor gliotoxint nem termelő *T. virens* törzseket is találtunk, ami a gliotoxin termelés képességének változatosságát mutatja a fajon belül. Továbbá, a gliotoxin-termelés kinetikájában eltéréseket tapasztaltunk a termelő törzsek között is. Míg a nagy mennyiségű gliotoxint termelő törzsek esetében a termelés optimális időszakának az inkubáció 48-64. óra közötti intervalluma tűnt, addig a kis mennyiséget termelő törzsek ez időszakban nem, vagy alig termeltek gliotoxint.

HARRACH BALÁZS

Adenovírusok koevolúciója gerinces gazdáikkal

MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet, Budapest

A gerincesek minden jelentősebb osztályához tartozó fajból izoláltak már adenovírusokat. Ezek összehasonlító vizsgálata egyrészt a genom-szerveződés elemzésével, másrészt kiválasztott gének filogenetikai analízisével folyik. Ismeretlen adenovírusokról is lehet előzetes molekuláris adatokat szerezni, még sikertelen vírusizolálás esetén is. Például a vírus DNS-polimeráz génjére tervezett degeneratív PCR primerekkel sikeresen azonosítottunk és részlegesen jellemeztünk hat, új hulló-adenovírust (Wellehan *et al.*, nyomdában). Eddigi eredményeink szerint az adenovírusok evolúciós útja aránylag jól követhető a halaktól a főemlősökig, és azt csak néhány gazdaváltás bonyolítja. Ez kivételesen szerencsés helyzetnek mondható, melyhez hasonlót más víruscsaládok esetében még nem sikerült találni. Feltételeztük, hogy az egymástól oly mértékben eltérő adenovírus csoportok, melyeknek külön vírusnemzetségbe sorolása indokolt, valójában a gerincesek különböző osztályaival együtt fejlődött adenovírus leszármazási vonalaknak felelnek meg. Ugyanakkor úgy véltük, hogy a molekuláris jellemzés akkor is felfedi a vírusok eredetét, ha gazdaváltás következtében napjainkban más gerinces osztály képviselőiben is előfordulnak. Elméletet állítottunk fel, hogy a kérődzőkben és madarakban található különleges adenovírusok, az atadenovírusok, ősi hullókból kerülhettek mai gazdáikra. Hipotézisünk bizonyítékának tekintjük, hogy eddig minden hullókból kimutatott (kígyó-, gekkó-, kaméleon-, szakállas agáma-, gila-) adenovírus valóban az atadenovírusokhoz tartozik mind genom-szerveződés, mind filogenetikai rokonság alapján. A gerincesek feltételezett evolúciós útjának ismeretében próbálkoztunk a vírus és gazda koevolúciójára vonatkozó következtetések levonásával. Úgy tűnik, hogy az adenovírusok evolúciós (törzsfajlódási) fája aránylag jól tükrözi gazdáik evolúcióját. Így a vízibaromfi fajokban (libában, barbari kacsában) található aviadenovírusok határozottan elkülönülnek a tyúkfélék számos adenovírus fájától. A rágcsálók adenovírusai korán elkülönülnek a többi emlős-adenovírustól, akárcsak a rágcsálók az emlősökön belül. A főemlősökkel közös őstől származtatott

mókuscickány adenovírusa is monofiletikus a főemlősök adenovirusaival. Filogenetikai számítások szerint a ragadozók és páratlanujjú patások viszonylag közeli leszármazásúak, és ez kimutatható kutya- és ló-adenovírusokról is. A gerincesek következő leágazása a *Cetartiodactyla*, ahová a párosujjú patások is tartoznak. Az adenovírusoknál is ennek megfelelő leágazáson található több bovin, ovin és porcín szerotípus. Az adenovírus evolúció fontos jellegzetességének látszik a genom fokozatos növekedése is. A genom középső részén található 17 gént valamennyi ma ismert adenovírus örökölte a közös őstől. A genomvégeken található, főként korai kifejeződésű gének azonban nemzetségenként nagy változatosságot mutatnak. A legtöbb genusban a genom jobb vége még gazdafajok, illetve vírus típusok szerint is variálódik, így elsődleges célja lehet a vírusnemzetségen belüli összehasonlító vizsgálatoknak.

HATVANI LÓRÁNT¹, KREDICS LÁSZLÓ², ANTAL ZSUZSANNA², SZEKERES ANDRÁS¹, MANCZINGER LÁSZLÓ¹

A réz hatása biológiai növényvédelemben felhasználható *Trichoderma* törzsek extracelluláris tripszin-típusú proteáz termelésére

¹SZTE TTK Mikrobiológiai Tanszék; ²MTA-SzTE Mikrobiológiai Kutatócsoport, Szeged

A *Trichoderma* fajok imperfekt fonalagombák, teleomorf alakjaik az Ascomycota törzs Hypocreales rendjébe sorolhatók. Egyes *Trichoderma* törzsek növénypatogén gombák hatékony antagonistái, melyre biológiai növényvédelmi eljárások alapozhatók.

A rézion a gombák növekedésének erős inhibitora, ezáltal a mezőgazdaságban széles körben alkalmazott fungicid. Másrésztől viszont csekély mennyiségben szükséges a normális növekedéshez, így más fémekkel, pl. a vassal, mangánnal és cinkkel együtt fontos nyomelem is egyben.

Az integrált növényvédelem fizikai, kémiai és biológiai módszerek együttes alkalmazásán alapul. Mivel a réz hatékony kémiai peszticid, a *Trichoderma* törzsek pedig potenciális biofungicidok, így az együttes alkalmazásukon alapuló, integrált növényvédelmi eljárások dolgozhatók ki. Az ilyen stratégiák sikeres fejlesztése szempontjából rendkívül fontos tanulmányozni a réznek a *Trichoderma* mikoparazitizmusában fontos szerepet játszó enzimek aktivitására gyakorolt hatásait.

A réz-szulfát extracelluláris tripszin-típusú proteázok termelésére gyakorolt hatását vizsgáltuk két, a biológiai növényvédelem céljaira ígéretes *Trichoderma* törzs – a *T. harzianum* T66 és a *T. aureoviride* T122 – esetében, és összehasonlítottuk három további vegyület, a mangán-klorid, vas(III)-klorid és cink-szulfát hatásaival. Réz-szulfát jelenlétében a tripszin-típusú proteáz enzimaktivitások jelentős mértékben emelkedtek, különösen amikor a tenyészetek nem tartalmaztak tejpport, az extracelluláris proteáz termelésének inducerét. Eredményeink alapján a rézionok nem a korábban termelt enzimek aktivitását emelik, hanem az extracelluláris tripszin-típusú proteázok szekrécióját indukálják. A legmagasabb enzimaktivitást mutató réz-szulfát tartalmú tenyészetek, valamint a kontroll tenyészetek felülcsúzóit gélszűrési kromatográfiával elválasztottuk, majd enzimaktivitásokat mértünk az egyes frakciókban. Réz-szulfát jelenlétében egyes extracelluláris tripszin-típusú izoenzimek jelentős mértékben túltermelődtek induktív és nem induktív körülmények között egyaránt. Ennek a felfedezésnek jelentősége lehet a természetes mikrobapopulációk antagonista kölcsönhatásai szempontjából. Eredményeink alapján a *Trichoderma* törzsek növénypatogén gombákkal szembeni antagonista hatása az integrált növényvédelem keretein belül fokozható lehet szubletális mennyiségű réz-szulfát hozzáadásával. Az alkalmazott réz-szulfát mennyisége rézrezisztens *Trichoderma* mutánsokkal történő együttes alkalmazás esetén növelhető is lehet. Ilyen integrált növényvédelmi eljárások alkalmazása megfelelő szintű növényvédelmet biztosíthat a környezet rézzel történő nagymértékű szennyezése nélkül is.

A munka az OTKA F037663 és az OMFB-00219/2002 támogatásával készült.

HEGEDŰS ANTAL¹, OLDAL BÁLINT^{2,3}, KECSKÉS MIHÁLY² ÉS BAYOUMI HOSAM E.A.F.²

A növények rizoszféra kezelésének módszertani vizsgálata

¹SZTE „Juhász Gyula” Tanárképző Főiskolai Kar, Szeged; ²SZIE Környezettudományi Doktori Iskola, Mezőgazdasági-, Környezeti Mikrobiológia és Talajbiotechnológia Ph.D. Program, Gödöllő; ³MTA Talajtani és Agrokémiai Kutatóintézet, Budapest

A növényi növekedés serkentésére képes rizobaktériumok (Plant Growth Promoting Rhizobacteria;

PGPR) kedvező volta a gazdasági haszonnövények terméshozzájárulásának a fokozásában, a növényi biomassza-termelés növelésében, valamint a növényegészség védelmére gyakorolt hatásban nyilvánulhat meg.

Az egészséges növények rizoszférájából izolált *Pseudomonas fluorescens* baktériumtörzsek közül a felhasznált növények fajspecifikus kórokozóikkal szembeni antagonistikus tulajdonságokkal rendelkező, hormontermelő törzseket használtuk fel.

A rizoszféra oltás során tápfolyadékban szaporított baktérium törzsekkel a vetőmagot, a csírákezdeményt és a vegetatív szaporítású járulékos gyökérkezdeményt kezeltük, csírámentes (steril) körülmények között. Felhasznált növények: búza, árpa, kukorica, paprika, paradicsom, gerbera és a szegfű.

A vizsgálatok során a növények termelési képességének változását mértük a *Pseudomonas fluorescens* baktériumtörzsekkel történt rizoszféra-kezelés hatására. Célunk a kezelés módszertani vizsgálata volt. Ennek során a növényeket steril, valamint nem steril körülmények között neveltük, így módon a PGPR mikroorganizmus rizoszférában történő megtelepedését, valamint a kifejtett élettani hatás mértékét vizsgáltuk.

A vizsgálatok értékelését varianciaanalízis módszerével végeztük.

A statisztikai vizsgálat eredménye szerint a csírámentes talajban történt növénynevelés szignifikáns módon ($P = 1\%$) segítette elő a *Pseudomonas* sp. törzsek termelési képességre kifejtett kedvező hatását. A gerbera és a paprika esetében a szignifikáns eltérés nagyobb mérvű volt a hozam minőségi ($P = 1\%$), mint a mennyiségi ($P = 10\%$; $P = 5\%$) tényezőire. A növények talajeredetű kórokozókkal szembeni tűrőképessége szignifikáns mértékben nőtt ($P < 1\%$) a búza, a paradicsom a gerbera és a szegfű növények esetében.

HERPAY MÁRIA

A klasszikus és molekuláris módszerek harmonikus egysége a korszerű enterális diagnosztikában

Johan Béla OEK Bakteriológia II., Budapest

A hagyományos enterális bakteriológiai diagnosztika célja a kórokozók kitenyésztése, azonosítása és antibiotikumokkal szemben mutatott érzékenységi vizsgálata: e cél megvalósítására a laboratóriumi diagnosztika az ún. klasszikus (fenotípusos jellemzők kimutatásán alapuló) mikrobiológiai módszerek széles tárházával rendelkezik. Napjainkban is kihívást jelenthet azonban egy fakultatív patogén faj (pl. *Escherichia coli*) kórokozó törzsének kimutatása székletből illetve az "emerging" (pl. STEC), "re-emerging" (pl. *V. cholerae*) kórokozók törzseinek korszerű diagnosztikája. Ezek mellett az ételbiztonság és ezzel együtt az ételbiztonsághoz vezető megbetegedések utóbbi években tapasztalt reflektorfénybe kerülése a klasszikus módszerek újra alkalmazását illetve korszerűbb protokollokba történő beillesztését kívánják meg. Több mint 30 éves múltat tekint vissza a molekuláris biológia eredményein, különböző gének kimutatásán alapuló diagnosztikus módszerek bevezetése. A molekuláris módszerek egyrészt a baktérium detektálás, másrészt a tipizálás területén váltak a baktériumok jellemzésének eszközévé. A diagnosztika területén alapvetően a hibridizáción alapuló ún. DNS-próbák (pl. különböző enteropatogén *Escherichia coli* törzsek azonosítására szolgáló próbák) és az amplifikációs eljárások (pl. PCR, multiplex PCR, nested PCR, NASBA, TMA) terjedtek el a fejlett országokban működő laboratóriumokban és e módszerek bevezetése - a gyorsabb és esetenként pontosabb vizsgálati tevékenység végzése érdekében -, a hazai laboratóriumok egyik fontos feladata is. A PCR alapú tipizáló módszerek (pl. RAPD, AP-PCR) az epidemiológiai oknyomozás, és a fertőző megbetegedések megelőzésének hatékony eszközei. A megfelelő molekuláris módszer kiválasztása nagy körültekintést kíván: értékelni kell a módszer reprodukálhatóságát, stabilitását és diszkrimináló képességét. Gyakorlati szempontból értékelni kell az árat, a módszer könnyű alkalmazhatóságát, és az eredmények interpretálhatóságát. Jelenleg ezen érzékeny molekuláris diagnosztikus módszerek pozitív eredményeinek klinikai, illetve járványtani relevanciája még nem minden esetben kellően tisztázott. A módszerek standardizálásának, validálásának és az Európai Unión belüli harmonizálásának folyamata napjainkban zajlik. Mindezek eredményeként a különböző laboratóriumok eredményei összehasonlíthatóbbá, a mennyiségi és minőségi összefüggések könnyebben megállapíthatóbbakká, a módszerek jobban automatizálhatóvá válnak.

HORVÁTH KATALIN¹, SZÉNÁSI ZSUZSANNA¹, DANKA JÓZSEF¹, BECSÁGH PÉTER², KUCSERA ISTVÁN¹, OROSZ ERIKA¹

Real-time PCR for rapid and quantitative detection of *Toxoplasma gondii*

¹Johan Béla OEK Parazitológiai Osztály, Budapest; ²Roche Magyarország Kft., Budaörs

A toxoplasmosis világszerte elterjedt fertőző betegség, amelyet egy parazita protozoon, a *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) okoz. Immunkompetens személyekben a fertőzés többnyire tünetmentes és veszélytelen. Ezzel szemben életveszélyessé válhat és számos rendellenességet idézhet elő a foetusban vagy immunkárosodott személyekben, mint például a HIV fertőzött és transzplantáción átesett betegekben. Ilyen esetekben az időben megkezdett kezelés hatékonyan csökkenti a károsodás mértékét. A toxoplasmosis hagyományos, szerológiai vizsgálatokon nyugvó diagnosztikája azonban nem kellően hatékony és nem megfelelő ezen betegek számára. Esetükben a diagnózis a parazita szövetből vagy testfolyadékából történő direkt kimutatásával állítható fel. A direkt kimutatás történhet szövettenyészttel és állatoltással. A szövettenyészttel azonban nem kellően szenzitív, az egéroltással történő vizsgálat pedig legalább három hetet igényel. A PCR kiküszöböli ezeket a hátrányokat, mivel a szövettenyésztténél érzékenyebb, és a diagnózis egy nap alatt felállítható.

A 'Johan Béla' Országos Epidemiológiai Központ Parazitológiai Osztályán LightCycler technológián alapuló kvantitatív PCR-t vezettünk be a *T. gondii* fertőzés megállapítására. A módszer az amplicon-specifikus próbák hibridizációján alapul, amelyekhez fluorofór molekulákat kapcsolunk. Ezek fluoreszcencia energia transzferre képesek, amikor a próba a target szekvenciához kötődik. Ez a módszer lehetővé teszi az amplifikátum keletkezésének valós idejű mérését.

Vizsgálatunkban különféle PCR módszerek érzékenységét hasonlítottuk össze, köztük nested, seminested, kereskedelmi forgalomban kapható és LightCycler PCR módszereket. A különböző PCR vizsgálatok target génjei a B1, a SAG2 és a TGR1E gének voltak. Az egyes módszerek érzékenysége <50 és 5000 parazita/ml között volt. A legjobb érzékenységet a nested és a LightCycler PCR módszerek mutatták.

A *T. gondii* DNS jelenlétének meghatározására bevezetett real-time LightCycler PCR módszerünk reprodukálható kvantitatív eredményt szolgáltat, és a DNS kivonását is beleértve mindössze három órát vesz igénybe. Ezáltal a módszer nem csupán a parazita DNS-ének detektálására alkalmas, de a parazita mennyiségének mérésével a gyógyszeres kezelés hatékonyságának nyomon követése is lehetővé válik.

Toxoplasmosis is a worldwide infectious disease caused by the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). The infection is usually asymptomatic and harmless in immunocompetent patients, but can be life-threatening or responsible for severe sequelae in fetuses or in immunocompromised individuals such as HIV-positive and transplant patients. In these situations, early treatment significantly reduces the extent of the damage. However, the classical diagnosis of toxoplasmosis based on serological tests is inefficient and inadequate in these patients. Therefore, the diagnosis is based on the direct demonstration of the parasite in tissues or biological fluids. This can be achieved by tissue culture or mouse inoculation. However, tissue culture not very sensitive and inoculation of mice takes more than three weeks to complete. PCR overcomes these shortcomings, because more sensitive and the diagnosis can be confirmed within one day.

In the Department of Parasitology of the 'Johan Béla' National Center for Epidemiology, we have introduced a quantitative PCR for the diagnosis of *T. gondii* infection based on the LightCycler technology. This technology relies on hybridisation of amplicon-specific probes with adjacent fluorophores capable of fluorescence resonance energy transfer when they bind to the target sequence. This technology provides a real-time measure of the amplification product.

In our study we compared the sensitivity of PCR methods including nested, seminested, commercially available and LightCycler PCR method. The PCR tests were targeted at the *T. gondii* B1, SAG2 and TGR1E gene. The sensitivity of the different methods varied between <50 and 5000 parasites per ml. The best sensitivity results belonged to the nested and LightCycler PCR.

The real-time quantitative LightCycler PCR system that we have introduced for determination of *T. gondii* DNA gives reproducible quantitative results and has a fast turnaround time of less than three hours, including the DNA extraction steps. Since, this method can be used not only to detect the presence of the parasite DNA but also provide evaluations of the parasite load in patients, this PCR test

should be useful for the monitoring of treatment efficacy.

IGLÓI ATTILA¹, HERNÁDI FERENC², KERESZTÚRI PÉTER¹, PELES FERENC ÁRPÁD¹, SZABÓ ANDRÁS¹

In vitro *Candida albicans* sejtdifferenciálódási modell alkalmazása kemoterápiai kutatásokban

¹DE ATC Mezőgazdasági Mikrobiológiai Tanszék; ²OEC Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Debrecen

A *Candida albicans* gömbsejtes élesztőformából csíratömlőképzésen keresztül fonalas formává differenciálódása fontos patogenitási faktornak tekinthető. Ez az in vivo lejátszódó morfológiai változás in vitro is előidézhető. Azonban a hagyományos tápközegekben nem történik morfológiai változás, az élesztősejtek sarjadzással szaporodnak. A sejtdifferenciálódási modellben lejátszódó morfológiai átalakulás révén kifejlődnek azok az alakok is (csíratömlő, hifa), amelyek infekció esetén az emberi szervezetben is megtalálhatóak. Így az ilyen modellek alkalmasak az in vivo viszonyokat közelítő in vitro vizsgálatokra.

Célkitűzésünk az volt, hogy egy olyan in vitro modellt dolgozzunk ki, amelyben a sejtek jelentős részénél detektálható a fent említett átalakulás, majd e modell alkalmazásával vizsgálni kívántuk már ismert ill. potenciális antimikotikumok gombasejt-differenciálódásra kifejtett hatását.

Előkísérleteinkben kiválasztottuk a legalkalmasabbnak mutatkozó táptalajokat és tesztörzseket, majd vizsgáltuk az inkubációs idő és hőmérséklet, az inokulummértet, a pH, különböző kémiai ágenssek és egyéb tényezők hatását előbb több, majd egy gombatorzs esetében. Ezen vizsgálataink alapján a kiválasztott, klinikai izolátumból származó 134/95-ös *C. albicans* törzs esetén optimális tenyésztési körülmények között a csíratömlőképző alakok aránya $84.9 \pm 6.1\%$ volt.

Ezt követően különböző antifungális szerek morfológiai átalakulást befolyásoló hatását vizsgáltuk. Eredményeinket a kontroll százalékában adjuk meg. Az 5-fluorocitozin esetében nem találtunk gátló hatást még igen nagy, 128 mg/l-es koncentrációban sem ($87.3 \pm 11.5\%$). A poliének, a nystatin és az amphotericin B 8 mg/l-es koncentrációi nagy mértékben gátolták a csíratömlőképzést ($0.7 \pm 0.7\%$ ill. $0.8 \pm 0.8\%$). Az imidazol származékok 8 mg/l-es koncentrációjánál az econazol ($7.7 \pm 4.7\%$) nagyobb mértékben gátolta a csíratömlőképzést, mint a ketoconazol ($35.0 \pm 11.1\%$) és a miconazol ($33.5 \pm 2.5\%$).

Vizsgálatainkból megállapítható, hogy a sejtmembrán ergoszteroljához kötődő poliének, ill. az ergoszterol szintézist gátló azolok fejtenek ki a morfológiai átalakulásra gátlóhatást, míg a gomba nukleinsav szintézisét gátló 5-fluorocitozin nem. Úgy tűnik, hogy a morfológiai átalakulás gátlása a sejtmembrán károsítással függ össze.

Modellünkben potenciális antifungális szerek szűrését kezdtük meg, megvizsgáltunk többek között 22 piridazin-azol vegyületet ill. 5 kalkonszármazékot, melyek közül több jelentősen gátolta a morfológiai átalakulást.

Tehát sikerült kidolgozni egy olyan in vitro *C. albicans* sejtdifferenciálódási modellt, amely alkalmas különböző antifungális szerek morfológiai átalakulásra kifejtett hatásának kvantitatív vizsgálatára. Sejtdifferenciálódási modellünk, a konvencionális táptalajokkal együtt alkalmazva, megnövelheti az új, potenciális antifungális szerek in vitro szűrésének hatékonyságát.

ILYÉS HEDVIG¹, DU MUYING^{1,2}, FEKETE ERZSÉBET¹, SZENTIRMAI ATTILA¹, MICHEL J. A. FLIPPHI³, CHRISTIAN P. KUBICEK⁴, KARAFFA LEVENTE¹

A Leloir-útvonal mutációja megváltoztatja a galaktózon növény *Aspergillus nidulans* gomba NADPH-igényét és produkcióját

²Southwest Agricultural University, Chongqing, China; ³Centre Universitaire d'Orsay Institute de Genetique et Microbiologie, Paris, France, ⁴TU Bereich Molekulare Biotechnologie, Wien, Austria

Korábban bebizonyítottuk egy Leloir-útvonaltól független D-galaktóz lebontási út meglétét és működését az *Aspergillus nidulans* fonalas gombában, megmagyarázva ezáltal a galaktokináz mutánsok (*galE*) növekedését D-galaktóz szénforráson. Az új útvonal első lépése a D-galaktóz galaktitollá redukálódása. Az *A. nidulans* dializált sejtmentes kivonata NADPH jelenlétében a galaktózt galaktitollá, a galaktitolt NADP⁺-függő módon galaktózzá alakítja; a közreműködő enzimet azonban még nem ismerjük. Mivel emlős sejtekben a D-galaktóz galaktitollá történő redukcióját az aldóz reduktáz katalizálja, a gomba aldóz reduktáznak pedig szubsztrátja a galaktóz, feltételeztük, hogy ez az enzim felelős a redukcióért.

A D-galaktóz lebontás alternatív útja csak akkor működik, ha nitrogénforrásként ammónium ionokat használunk; nitrát ionokon inaktívvá válik. Ezt az aldóz redukáz NADPH-igényével magyaráztuk, ami a szintén NADPH-igényes nitrát és nitrit redukáz együttes hatása miatt meghaladhatja a sejt NADPH-termelő kapacitását. Hipotézisünk teszteléséhez az oxidatív pentóz-foszfát ciklus első két enzimének (glükóz-6-foszfát dehidrogenáz, 6-foszfoglükonsav dehidrogenáz) aktivitását vizsgáltuk meg különböző szén-és nitrogénforrásokon, vad típusú és *galE* mutáns sejtekben. Az aktivitási értékeket a szukcinát dehidrogenáz aktivitáshoz viszonyítottuk, kiküszöbölve ezáltal a növekedési ráta eltéréseiből adódó hibákat. Megállapítottuk, a micéliumok képesek ellensúlyozni a megnövekedett NADPH-igényt – ezt az enzimaktivitásokból számolt NADPH-termelési ráta fokozódása jelezte NADPH-igényes szubsztrátumokon. A lebontásához mólónként 2 mól NADPH-t igénylő L-arabinózon + nitrát ionokon növesztve a *galE* mutáns és a vad típusú tenyészetek megegyező biomassza képződési és L-arabinóz lebontási rátát mutattak. Mindezek miatt úgy véljük, az *A. nidulans galE* mutáns D-galaktóz + nitráton észlelt növekedési képtelensége nem magyarázható NADPH-hiánnyal.

IMRE ARIEL¹, OLASZ FERENC², NAGY BÉLA¹

***Salmonella enteritidis* törzsek célzott transzpozon-mutagenézise és a mutánsok geno- és fenotípusának vizsgálata**

¹MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet, Budapest; ²Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ, Gödöllő

Munkánk során, amely az NKFP keretében zajló Salmonella-vakcina fejlesztés része, flagellin-hiányos, negatív fehérje-markerral ellátott törzseket terveztünk létrehozni irányított mutagenézissel. Az irányított mutagenézis végrehajtásához a vad típusú IS30 transzpozázót fúzionáltattuk a flagellin fázisváltásban szabályozó szerepet betöltő, *S. typhimurium*-ból származó FljA represszor-fehérjével. A fúziós konstrukció elméletileg az FljA kötőhelye, azaz a flagellin operon operátorának környezetében idéz elő mutációkat, így hatékonyabb, mint a random transzpozon-mutagenézis. Az elvégzett irányított mutagenézis eredményeként a baromfi eredetű *S. enteritidis* 16-os és S.E. 11-es törzsünkben izolált mutánsok több mint 50%-a csökkent motilitást mutatott, míg a vad típusú transzpozáz esetén csak 2,5%-nak csökkent a mozgásképesége. A S.E. 11-es törzsből négy olyan mutáns sikerült előállítanunk, amelyek csillótermelésüket és mozgásképesességüket irreverzibilis módon elveszítették. Ezzel szemben a kontrol vad IS30-cal elvégzett mutagenézis hasonló számú mutánsa között nem találtunk nem-mozgó törzset. Számos olyan mutáns is analizáltunk, melyek mozgásképesége lényegesen csökkent. Ezek az inszerciók az *E. coli* *arcA* általános expressziós modulátor gén környezetében fordultak elő nagy gyakorisággal. Az így előállított, flagella nélküli, ezáltal negatív fehérjemarkerral ellátott törzsek virulenciáját csibemoddellen teszteltük. Az orális úton fertőzött naposcsibék májában és lépében vizsgáltuk a mutáns törzs megjelenését, valamint az állatok vakbél tartalmában elért csíraszámot mértük öt nappal a fertőzés után. Eredményeink szerint a flagellin hiányos törzs a szervi inváziót tekintve kevésbé virulens a szülői *S. enteritidis* 11 törzsnél, a vakbélben viszont magasabb csíraszámokat képes elérni.

A munkát az NKFP 04/040/2001 támogatta.

JAKUCS ERZSÉBET, KOVÁCS M. GÁBOR, ERŐS-HONTI ZSOLT

Új tomentelloid ektomikorrhizák alföldi lomboserdeinkből

ELTE TTK Növény szerkezettani Tanszék, Budapest

Az ún. 'tomentelloid' ektomikorrhizák (EM) mikrobiontái a *Tomentella* és néhány közel rokon nemzetség (Thelephoraceae, Basidiomycetes) tagjai. A Nagyalföld lombos erdeiben (*Populus* és *Quercus*) végzett négyéves vizsgálat során kilenc tomentelloid EM morfortípust mutattunk ki. Ebből ötöt elsőként jellemeztünk mikroszkópos morfológiai és anatómiai módszerekkel. A mikorrhizák meghatározását molekuláris taxonómiai módszerrel, a nrDNA ITS régiójának filogenetikai analízisével végeztük el (neighbor-joining, maximum parsimony és maximum likelihood). Ennek során 18 saját mikorrhiza szekvenciát és 36 génbanki, termőtestből származó szekvenciát hasonlítottunk össze. Faji szintű meghatározást végeztünk a *Tomentella galzinii*, *T. subtestacea*, *T. sublilacina*, *T. pilosa*, *T. ferruginea* és *T. stuposa* esetében, a többi három morfortípus taxonómiai helyzetét pedig sikerült

megközelíteni. Az eredményeket az irodalmi morfológiai adatok alátámasztják. Megbecsültük az EM morfortípusok relatív abundancia értékeit a talajmintákban. Eredményeink magas diverzitást és abundanciát mutatnak és megerősítik, hogy a tomentelloid ektomikorrhizák a mérsékeltvízi lomboserdők EM közösségeinek jelentős tagjai.

JANKOVICS ISTVÁN, VISNYOVSKY ÉVA, BERENCSI GYÖRGY

A magyar influenza oltóanyag története

Johan Béla OEK Virologiai Főosztály, Budapest

Az Országos Közegészségügyi Intézet Virologiai Osztálya a Rockefeller Alapítvány által 1936-ban létesített Közép-Európai Influenza Központból fejlődött ki. 1937-ben izolálták az első influenza vírust vadászményéten – R.M Taylor és tanítványa, Dreguss Miklós. A következő években az embrionált tyúktojáson való tenyésztést is bevezették. A háborús éveket követően az 1949-es influenza járvány virológia feldolgozásáról már Farkas Elek és Takátsy Gyula számolt be a Népegészségügy hasábjain. Az ő tanítványuk volt Dömök István, aki az 1950-51 évi influenza járványt feldogozta, és Magyarországon először izolálta az influenza C vírusát.

Az 50-es évek intenzív kutatómunkáját a Takátsy féle mikrotitrátor felfedezése lényegesen meggyorsította. 1962-től megkezdődött az influenza elleni oltóanyag előállítás is az OKI Virologiai Osztályán. A kezdeti néhány tízezer dózis 1968-ra – a Hong Kong-i pandémia kezdetére már néhány százezerre növekedett. A Hong-Kong járvány kezdetéig 600 ezer adag védőoltást termelt az intézet, ami kétszerese volt a Nagy-Britanniában rendelkezésre álló mennyiségnek.

A 80-as években kidolgozták a magas hozamú (high yield) reasszortánsokat. Sokat fejlődött a vakcina ellenőrzésének feltételrendszere is. Elkerülhetetlenné vált a védőoltás gyártásának a modern technológia szerint megvalósított termelése, ami jelentős beruházások nélkül nem volt lehetséges.

A WHO a várható világjárvány miatt szintén szorgalmazta más nemzetközi szervezetekkel együttműködve az országok önerejű felkészülését a pandémiára. Ennek is új oltóanyag-termelő kapacitás létrehozása volt a feltétele, amely az új pandémiás altípus megjelenése után rövid idővel képes a lakosság jelentős része számára, különösen a veszélyeztetett betegcsoportok számára, a szokásos oltóanyag mennyiség többszörösét előállítani.

Az OEK szakembereinek közreműködésével, Dömök dr. vezetésével, a 90-es évek közepére a feltételei létrejöttek: pandémia veszélye esetén nagyon rövid idő alatt GMP-konform körülmények között közel 5 millió dózis hazai oltóanyag előállítására alkalmas gyártókapacitás áll rendelkezésre.

Az elmúlt évtizedben az influenza laboratóriumi surveillance fokozatosan légúti surveillance szintjére emelkedett nem utolsósorban a járványtanászok és vakcina termelők anyagi és erkölcsi támogatásával.

Az adjuvánssal működő inaktivált, tisztított teljes vírust tartalmazó, védőoltás szinte kizárólag Magyarországon maradt meg a világon, amelynek a tojásfehérje tartalma lényegesen alacsonyabb, mint a külföldön gyártott oltóanyagoké. A következő influenza világjárvány fenyegetése felveti annak lehetőségét, hogy a világ más termelői is visszatérnek ennek az oltóanyagoknak a gyártására, hogy nagyobb tömegű és kevésbé ártalmas vakcinákkal lehessen megelőzni a világjárvány következményeit.

JENEY APOR¹, BÉKI EMESE¹, KESZTHELYI ANITA^{1,2}, HORNOK LÁSZLÓ^{1,2}

Fonalgombák aminosav transzporterei

¹Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont; ²SZIE Mezőgazdasági Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék MTA Mikológiai Kutatócsoport, Gödöllő

A fonalgombák aminosav transzportereit (permeázait) a *Neurospora crassa*ban elfogadott felosztás szerint öt csoportba sorolják. Az 1. csoportba tartozó transzporterek a neutrális alifás és aromás aminosavak felvételében működnek közre, a 2. csoportba tartozók a bázikusakéban; a 3. csoportot az ún. általános aminosav transzporterek alkotják, a 4. a savas transzport rendszer, míg az 5. specifikusan a metionin felvételében vesz részt. Az aminosav transzport rendszerek tanulmányozása hozzájárul a gombák növekedésének, életciklusának és szekunder metabolit termelésének szabályozására meglévő ismereteink bővüléséhez.

A világszerte elterjedt, mikotoxintermelő, növénykórokozó *Gibberella fujikuroi* gombában életciklus-

specifikus transzkripciósi folyamatokat vizsgáltunk. E munka során azonosítottunk egy feltételezett aminosav transzporter gént, amely erős expressziót mutatott a konídiumcsírázás állapotában és represszált állapotban volt a késői stacionáris fázisban. A gén szekvencia elemzése alapján a feltételezett kódoló régióban két ORF-et azonosítottunk (156 és 1227 bp hosszúságúakat), amelyek között egy rövid (53 bp hosszúságú) intron helyezkedik el. A rövidebbik ORF translációs startja előtt, 986 bp hosszúságú szekvencia szakaszon jellegzetes CAAT boxokat azonosítottunk, amelyeknek bizonyítottan szerepük van a transzkripciósi szabályozó faktorok megkötésében. Találtunk továbbá olyan, kétszer ismétlődő TGACTC szekvenciát, amely a *Neurospora crassa* esetében az aminosav bioszintézis általános szabályozásában résztvevő CPC1 fehérje felismerő szekvenciája. A feltételezett aminosav transzporter gén a *Penicillium chrysogenum* aromás és neutrális alifás aminosav permeázát kódoló génjével, valamint a *Neurospora crassa* ún. metiltriptofán rezisztens (*mtr*) génjével mutatott meggyőző azonosságot, ami azt sugallja, hogy ez az újonnan leírt gén a transzporterek 1. osztályába tartozik. Újdonságnak számít, hogy a *G. fujikuroi* ezen új aminosav transzporter génje erős expressziót mutatott csírázáskor, szemben a késői stacionáris fázisban észlelhető represszálttsággal. Eddigi adatok szerint ugyanis, a fonalas gombák 1., 2. és 3. csoportjába tartozó aminosav transzporterek konstitutívan expresszálódnak.

A kutatást az OTKA T37546 és T43221 pályázatok támogatták.

JUHÁSZ ÁKOS, ENGI HELGA, HAMARI ZSUZSANNA

***Aspergillus tübingensis* törzsek mtDNS analízise**

SZTE TTK Mikrobiológiai Tanszék, Szeged

Az *Aspergillus* genus a fonalas *Ascomycota* mikroszervezetek egyik legintenzívebben tanulmányozott csoportja. Az általunk vizsgált *Aspergillus tübingensis* a szakzsargon által fekete *Aspergillus*ok (Section Nigri) néven emlegetett csoportba tartozik. A szekcióba tartozó fajok imperfektek, ezért jelentős az izolátumok közötti inter-(fajok közti), és intraspecifikus (egy fajba tartozó izolátumok közötti) variabilitás. Különösen a mitokondriális genom mutat jelentős polimorfizmust. Korábbi kutatások számos ide tartozó faj mitokondriális DNS (mtDNS) polimorfizmusát már vizsgálták, és kiderítették az eltérések okát. A munkánk célja az *A. tübingensis* mtDNS variabilitásának vizsgálata, és a különbségek okainak kiderítése volt.

Az *Aspergillus tübingensis* mtDNS RFLP (restrikcion fragment length polymorphisms) mintázat alapján hat csoportba osztható (2a-2f). Elkészítettük a hatféle típus részletes fizikai térképét *EcoRI* és *BglII* restrikciós enzimekkel. A funkcionális térképeket Southern-hibridizáció és PCR termék méretösszehasonlítása alapján szerkesztettük meg. A 2b típus funkcionális és hat-enzimes részletes fizikai térképe korábbi vizsgálatok eredményeként rendelkezésünkre állt, az adatokat összehasonlítási alapul használtunk fel munkánk során. A különböző típusú mitokondriális genomok mérete 30,5-33,0 kb között változott. A megfigyelt mtDNS RFLP polimorfizmus és a méretbeli eltérések ellenére a restrikciós hasítóhelyek egymáshoz viszonyított elhelyezkedése sok azonosságot mutatott. A gének száma és sorrendje megegyezett a különböző mtDNS-ekben. A mitokondriális genomok méretében mutatkozó eltéréseket vizsgálataink alapján a *cox1* és a *cob* gén eltérő introntartalmára vezethettük vissza. Korábbi vizsgálatok eredménye alapján a 2b mtDNS típus *cox1* gén szekvenciája ismert, a gén három intront tartalmaz. PCR primereket terveztünk a 2b exonjaihoz, amelyeket felhasználva és egymással kombinálva a 2b *cox1* gént több átfedő részletben, valamint a három intront külön-külön fel tudtuk szaporítani. Ezen primerek segítségével megvizsgáltuk a 2a, 2c, 2d, 2e és 2f *cox1* gének lehetséges introntartalmát. A PCR eredmények alapján kapott intronmegoszlás megfelelt a térképek *cox1* régiókban mutatott méretbeli eltéréseinek, amely végső soron befolyásolta a mitokondriális genom végső méretét. A két legnagyobb genommal rendelkező törzs a 2b és 2e (33,0 kb) volt. Ezekben mind a három *cox1* intron megtalálható. A 2c típusú mtDNS a legkisebb méretű (30,5 kb), a *cox1* gén csak egy intront tartalmazott. A 2a és 2d mtDNS-ek köztes méreteket mutattak (32,3 és 32,1 kb), a *cox1* génjük 2-2 intront tartalmazott. A 2f mtDNS típus szintén kettő *cox1* intront hordozott, mérete azonban nagyobbak bizonyult (32,7 kb) a szinten két *cox1* intronos 2a és 2d-hez hasonlítva. Ennek oka, hogy a 2f típus *cob* génje feltételezhetően (szekvenciaanalízis folyamatban van) legalább egy intront tartalmaz, amely megmagyarázza a 2a és 2d-hez viszonyított nagyobb mtDNS méretet.

JUHÁSZ ATTILA¹, ÖTVÖS RITA¹, VERESS IMRE¹, NÉMET TAMÁS², IFJ. GERGELY LAJOS³, SZABÓ ÉVA¹, HUNYADI JÁNOS¹

Parapoxvírus zoonosis, esetismertetés

¹DEOEC Bőrgyógyászati Klinika, ²DE OEC Patológiai Intézet, ³DE OEC III. Belgyógyászati Klinika, Debrecen

K.A. 36 éves férfibeteg hajas fejbőrén, felvételét megelőzően 3 héttel keletkező egy diónyi, egy babnyi és egy lencsényi exulcerálódott hyperaemias környezetű tumorok miatt került felvételre. Műtét előtti sebváladék tenyésztése MRSA pozitív, amely moxifloxacin kezelésre reagált. Vancomycin profilaxisban végzett pyogen granulomának véleményezett tumorok in toto excisioja local anesthesiában történt. A fagyasztott metszet melanomát nem valószínűsített, de angiomasos tumor ill. B-sejtes lymphoma lehetősége vetődött fel. Az előbbieket és a beteg foglalkozása körében, rendszeresen állatokkal történő kontaktusa miatt további vizsgálatok történtek brucellosis, toxoplasmosis, leptospirosis, borreliosis, bartonellosis. A végleges szövettani vélemény T-sejtes low grade lymphomának megfelelő lymphomatoid papulosis, melynek sejtjei és immunhisztokémiai fenotípusa alapján anaplasticus nagysejtes lymphoma korai transzformációja vetődött fel. Ezért és a bal axillaris nyirokcsomók tapintható megnagyobbodása miatt a beteg teljes hematológiai kivizsgálásra és gondozásba vételére is sor került. Az angiomasos tumor és/vagy lymphoma lehetséges hátterének kutatására gamma-herpesvírusok irányába történt vizsgálat.

A célzottan végzett, zoonosisok irányába történt vizsgálatok nem hoztak érdemi eredményt. A hematológia vizsgálatok non-Hodkin lymphoma irányába kezelés nélküli követést javasoltak.

A gamma-herpesvírusok irányába történő vizsgálat a herpesvírusok DNS-polimeráz génjének consensus-PCR reakciójával került megközelítésre. A reakció eredményeként a mintából a herpesvírus pozitív kontrollhoz képest egy kb. 100 bp-al nagyobb DNS szakasz amplifikálódott. Az amplicon szekvenálása és szekvencia analízisének eredménye a Parapoxvírus genusba tartozó Orf vírus vagy Bovin papular stomatitis vírus fertőzést igazolt. A vírus további pontos identifikálása és tipizálása eddig nem történt meg.

A virológiai eredmény teljesen megfelel az irodalomban leírt és poszterünkön is dokumentált parapoxvírus fertőzések klinikai képének és lefolyásának. A fertőzést annak ellenére sikerült molekuláris biológiai módszerekkel igazolni, hogy a parapoxvírus fertőzés irányába célzott vizsgálat indikálása nem vetődött fel. Az eset felhívja a figyelmet a ritka zoonosisok diagnosztikai problémájára, valamint a klinikum és a laboratórium közötti szorosabb együttműködés fontosságára.

JUHÁSZNÉ ROMÁN MARIANN¹, VARGA ZSUZSA², TÓTH ÁRPÁD³

Kefirek, probiotikumok előállítására laktózhidrolizált tejből kefir-kultúra és *Bifidobacterium breve* fermentálásával

¹BCE Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék; ²SOTE Dietetikai Tanszék; ³BCE Alkalmazott Kémia Tanszék, Budapest

A laktózhidrolizált tejből készült, különlegesen fermentált tejtermékek (ú.n. laktózmentesített termékek) a tápcsatorna működését és mikroflóráját pozitívan befolyásolhatják laktóz-intoleráns egyének esetén. Számtalan előnyös hatás kötődik a tejsavbaktériumokhoz és a probiotikus bifidobaktériumokhoz, amelyet preventív jelleggel az egészségvédő táplálkozás hasznosíthat. Például: -a tápcsatorna mikroflóra egyensúlya, -egy antibiotikumszedés után a probiotikus fajok visszatelepítése, -egy feltételezett koleszterin-csökkentő hatás, -valamint a vastagbélrák potenciális megelőzése, amely a szakirodalomból ismert. A hagyományos kefir-kultúra fajai nem tartoznak a tápcsatorna honos mikrobiótájához és nem is települnek meg ott. De humán tápcsatorna eredetű tejsavbaktériumok és *Bifidobacterium* fajok - laktózhidrolizált tejből savanyított tejtermékek előállítására alkalmazva - megnövelik a laktózmentes tejtermékek dietetikai hatását, egészségvédő jellegük így a laktózzérékenységekben szenvedők számára is érvényesül. (probiotikumok) Kísérleteinkben laktózhidrolizált tej hagyományos kefir-kultúrával, valamint probiotikus baktériumfajokkal (*Bifidobacterium breve* és *Lactobacillus rhamnosus*) kiegészítve került fermentálásra. A probiotikus fajok antibiotikumérzékenységét, a savasságot és a tejsavbaktériumok élősejtszámát, valamint a legfontosabb aromaadó vegyületeket vizsgáltuk. A savtartalom magasabb és az aroma-profil is eltérő volt (ecetsavban gazdagabb) a probiotikus fajokkal kiegészített mintákban, mint

a csak hagyományos kefir- kultúrával fermentált tejtermékek esetén.

KAPUSINSZKY BEATRIX, DOMONKOS TÁNYJA, JANCSÓ ÁGNES, KÓSA ZSUZSA, KUBASZOVA TAMARA, MOLNÁR ERZSÉBET, NAGY GÁBOR, BERENCSI GYÖRGY, DÖMÖK ISTVÁN

A Sabin oltások hatékonysága és a lakosság védettsége a gyermekbénulás felszámolása során

Johan Béla OEK Virologiai Főosztály, Budapest

A Sabin féle élő gyermekbénulás elleni védőoltást 1958-ban vezették be Magyarországon. Az enterovírus laboratórium feladata volt az évi 300 először monovalens oltóanyaggal oltott gyermek vírusürítését és immunválaszát mérni 1962 és 1972 között. A teljes mintasorozatot (12 székletminta és 2 vérsavó) mintegy 1500 gyermek esetében sikerült begyűjteni. A vírustenyésztés összesített eredményei azt mutatják, hogy 167 non-polio enterovirust (NPE) sikerült az oltási kampányok előtti mintákból kitenyészteni. A védőoltási sorozatok végén azonban már csak 33 ill. 42 NPE vírustörzs tenyésztett ki. Ezért a 20-25 %-ra történő csökkenésért a védőoltás interferáló tulajdonsága valamint a téli évszakban szokásos kisebb vírusterjedés lehetett felelős. A vírusizolátumok évenkénti elemzése azt mutatta, hogy bizonyos szerotípusok felerősödtek az OPV adagolást követően. Ez kizárólag az interferencia iránti ellenállóképesség következménye lehet. Az enterovírusok interferencia érzékenységét hazánkban először Molnár Erzsébet és Dömök István doktorok figyelték meg az 1958-ban lezajlott Bornholm járvány során, amit coxsackie B3 okozott, és a bénulással járó poliomyelitis megbetegedések számát 97 %-kal csökkentette. Fordított jelenség zajlott le 1989-ben, amikor a monovalens OPV beadása 450 ezer gyermek számára két héten belül megállította az echovirus 11' terjedését. A védőoltási rendszert 1992-ben alapvetően módosították. Azóta egyetlen egy vakcinához társult poliomyelitis megbetegedés (VAPP) sem történt az országban. Ezt a betegséget először Dr. Dömök István írta le. Az új oltási rendszer ellenőrzése 2000-ben történt meg először, bizonyítva, hogy 1-3 % alatt van a szeronegatív gyermekek aránya a lakosságban a 6-éves korban végzett oltás előtt. Az eredmények 3500 9 év alatti gyermek vérsavójának a vizsgálatán alapulnak.

KARAFFA LEVENTE¹, FEKETE ERZSÉBET¹, ILYÉS HEDVIG¹, SZENTIRMAI ATTILA¹, CHRISTIAN P. KUBICEK²

A karbon katabolit represszió és a specifikus növekedési ráta kapcsolatának vizsgálata *Aspergillus nidulans*-ban

¹DE TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék, Debrecen; ²TU Bereich Molekulare Biologie, Wien, Österreich

A CreA nevű transzkripciós represszor közvetítette karbon katabolit szabályozás általános jelenség a fonalas gombák világában, de a mechanizmus, mely révén a glükóz kiváltja a karbon repressziót, még kevésbé ismert. Munkánk során azt a lehetőséget vizsgáltuk, hogy a specifikus növekedési ráta szabályozza-e a CreA-függő karbon katabolit represszió megjelenését. Ehhez az aszkuszos fonalas gombák egyik modell-szervezetének számító *Aspergillus nidulans* glükóz-limitált, folytonosan növekvő kemosztát tenyészeit, és a bizonyítottan CreA-függő karbon szabályozás alatt álló β -galaktozidáz aktivitás megjelenését vizsgáltuk. Kontrollnak két másik aktivitás – a glükóz által, de CreA-függetlenül represszált izocitrát liáz és a konstitutív galaktokináz – megjelenését tekintettük.

Négy különböző hígítási rátán ($D=0.095\text{ h}^{-1}$, 0.068 h^{-1} , 0.045 h^{-1} and 0.015 h^{-1}) futtatott kemosztát tenyészet elemzése azt mutatta, hogy a β -galaktozidáz aktivitás képződése a két legmagasabb hígítási rátán gátolt, azonban a hígítási ráta csökkenésével párhuzamosan a represszió gyengül, végül $D=0.015\text{ h}^{-1}$ értéknél teljesen megszűnik, és a β -galaktozidáz aktivitás értéke megegyezik a derepresszált szakaszos tenyészetekben mérhetővel. A karbon derepresszált (*creA*-nullmutáns) *A. nidulans* törzssel végzett kemosztát tenyészetben hígítási rátától független, konstans β -galaktozidáz aktivitást mértünk, melynek értéke megegyezett a $D=0.015\text{ h}^{-1}$ hígítási rátán a vad típusú törzsnél mért értékkel. A kontroll aktivitások minden vizsgált hígítási rátán megegyező értékeket mutattak, a vad típusú és a *creA*-nullmutáns tenyészetekben egyaránt.

Megállapítható tehát, hogy a növekedési ráta glükózon meghatározója a karbon katabolit represszióknak *A. nidulans*-ban, és egy adott növekedési ráta érték alatt karbon derepresszió következik be.

KARDOS GÁBOR, MAJOROS LÁSZLÓ

Különböző testtájairól 2000-2003 között izolált *Candida* törzsek amphotericin B és flukonazol iránti érzékenységének összehasonlító vizsgálata

DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Debrecen

A DE OEC Bakteriológiai Diagnosztikai Laboratóriumában 2000 és 2003 között izolált *Candida* törzsek flukonazol és amphotericin B érzékenységét hasonlítottuk össze. Egy betegről adott évben csak az első izolátumot vettük figyelembe. Az érzékenység meghatározására E-tesztet és Fungitest-et alkalmaztunk. A vizsgált négy év alatt, bár a *C. albicans* gyakoriságának kismértékű következetes csökkenése megfigyelhető volt, jelentős, a rezisztencia eloszlását befolyásoló gyakoriságváltozást egyik species esetén sem tapasztaltunk. Az amphotericin B iránt nem érzékeny (mérsékelt érzékeny+rezisztens) törzsek aránya 6,6%-ról 3,2%-ra csökkent a vizsgált periódus alatt. A rezisztens törzsek száma mindegyik évben jóval alatta maradt a mérsékelt érzékeny törzsek számának. A csökkent érzékenységű törzsek mintafajta szerinti halmozódása nem volt megfigyelhető. A flukonazol iránt csökkent érzékenységet mutató (dózisfüggő érzékeny+rezisztens) törzsek aránya 12,1%-ról 17,2%-ra nőtt 2000-2003 között. A csökkent érzékenységű törzsek között évről évre nőtt a rezisztens törzsek aránya (23%-ról 54%-ra). A flukonazol iránt csökkent érzékenységhöz a *C. albicans* mellett elsősorban a *C. glabrata* és a genetikusan rezisztens *C. krusei* járult hozzá. A vizsgált periódus alatt a csökkent érzékenységű *C. albicans* és a *C. krusei* részaránya csökkent (24,7%-ról 14%-ra, illetve 40,5%-ról 22,5%-ra), míg a *C. glabrata* esetén ez az arány nőtt a (19,1%-ról 45%-ra). A rezisztencia mintafajta szerinti eloszlását tekintve az alsó légúti és a vizeletmintákból származó törzsek között az átlagnál magasabb volt a csökkent érzékenységű törzsek aránya, míg a száj és a felső légutak nyálkahártyáiról izolált törzsek esetében az átlag alatt maradt. Más mintafajtáknál hasonló jelenség nem volt egyértelműen kimutatható. Megvizsgálva a csökkent flukonazol érzékenységű *C. glabrata* és *C. albicans* valamint a *C. krusei* mintafajta szerinti eloszlását, a *C. glabrata* törzsek között a csökkent érzékenységűek aránya minden mintafajta esetén nőtt, 10-20% közötti értékről általában 50% körüli értékre. Kivételt képeznek a steril testtájairól és sebváladékból izolált törzsek, amelyek esetén a rezisztens+dózisfüggő érzékeny törzsek aránya alacsonyabb (38,2% 2003-ban), és a vizeletből származó izolátumok, amelyek között minden évben meghaladta az átlagot a csökkent érzékenységűek aránya (62,5% 2003-ban). A *C. albicans* esetén ilyen változás nem volt megfigyelhető, a nem-érzékeny törzsek aránya minden mintatípus esetén 5% körül, vagy az alatt volt a vizsgált periódusban. A *C. krusei* mintafajta szerinti gyakoriságában sem tapasztaltunk tendenciózus változásokat. Adataink azt mutatják, hogy a Debreceni Egyetem klinikáin a csökkent flukonazol érzékenység egyre gyakoribbá válásának hátterében elsősorban a *C. glabrata* rezisztenciájának drámai növekedése áll.

KAROSI TAMÁS¹, KÓNYA JÓZSEF², Z. SZABÓ LÁSZLÓ³, SZIKLAI ISTVÁN¹

A kanyaróvírus szerepe az otosclerosis pathogenesisében

¹DE OEC Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika; ²Orvosi Mikrobiológiai Intézet; ³OGYIK Fül-Orr-Gége Osztály, Debrecen

Az otosclerosis etiopathomechanismusa jelenleg is ismeretlen. Az oticus capsulában zajló perzisztens kanyaróvírus infekció azonban az otosclerosis egyik lehetséges kóroki tényezője lehet. A fertőzött sejtek felszínén bekövetkező, krónikus virális antigén expresszió szekunder autoimmun reakciót válthat ki a gazdaszervezet cellularis immunrendszere felől a belsőfül csontos tokja ellen. Az elmúlt 15 évben több közleményben is felvetődött a kanyaróvírus otosclerosisban betöltött etiológiai szerepe. Az otosclerosisos betegek stapedialp, illetve perilympa mintáiban a következő eljárásokkal sikerült igazolni a kanyaróvírus, valamint az ellene termelődött IgG jelenlétét: RT-PCR, immunhisztokémia, immunfluorescencia, immunelektronmikroszkópia és ELISA technika. A stapedectomiák során eltávolított, majd fagyasztott otosclerosisos stapedialp mintákból extraháltuk a nukleinsavakat (mRNS, vRNS, DNS). A kanyaróvírus RNS segmentumának amplifikációja RT-PCR segítségével történt: a reverz transzkripciót és a külső kör PCR amplifikációt a hőstabil rTth-polimeráz enzim hajtotta végre, míg a belső, ún. semi-nested körben Taq-polimerázt alkalmaztunk. Ezekben a reakciókban a kanyaróvírus meghatározott és konzervatív nukleoprotein, valamint mátrixprotein szekvenciáira

tervezett oligonukleotid próbákat alkalmaztunk. Élő, attenuált Edmonston- és Schwartze-típusú kanyaróvírus törzsek szerepeltek pozitív kontrollként, míg negatív kontrollnak corticalis csontot, stapes szárazakat, cadaver stapest, valamint nem otosclerosisos betegekből származó malleus és incus mintákat alkalmaztunk. A 102 otosclerosisos beteg esetén 62 stapestalp minta tartalmazott kanyaróvírus RNS-t. A kanyaróvírust a fent említett egyéb mintákban nem sikerült azonosítani. Ennek alapján a kanyaróvírus otosclerosisban betöltött szerepe kiemelkedő lehet. A 40 darab negatív stapestalp esetén valószínűleg genetikai otosclerosisossal, illetve egyéb okból bekövetkezett stapes fixációval álltunk szemben.

KERÉNYI MONIKA¹, SEBŐK BÉLA², PÁL TIBOR¹, SCHNEIDER IMRE³, HARANGI FERENC⁴

Atópiás dermatitises betegekből izolált *Staphylococcus aureus* törzsek jellemzése

PTE ÁOK ¹Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet; ³Bőrgyógyászati Klinika; ²Dorozsmai és Társa Egészségügyi Bt. Bőrgyógyászati Szakrendelés; ⁴Baranya Megyei Kerpel-Frónius Ödön Gyermekkórház, Pécs

Genetikai hajlam alapján kialakuló atópiás dermatitis (AD) tüneteinek kifejeződésében a *Staphylococcus aureus* kolonizációjának (orr, garat, bőr) és az általa termelt enterotoxinoknak (ET), mint szuperantigéneknek jelentős szerepet tulajdonítanak.

130 AD-ben szenvedő betegnél (2-12 év) orrból, garatból, bőrtünet esetén bőr felszínről bakteriológiai mintavétel történt. A kitenyészet *S. aureus* törzseknel az enterotoxinok és TSST gének hordozását (PCR technikával) illetve a biofilm képzést ellenőriztük

A vizsgált betegcsoport 76 tagjánál (58,4%) *S. aureus* tenyésztett ki legalább egy mintából.

A 172 törzs közül 57-et (33,1%) a vizsgált gyerekek orrából, 54-et (31,4%) torkából, és 61-et (35,4%) a bőréről izoláltunk. 18 gyerek egyik szülőjénél szintén találtunk *S. aureus* hordozást orr-garat mintavételnél. A gyerekektől származó mintáknál enterotoxin(ET) A génjét 28, ET B génjét 13, ET D génjét 4, TSST génjét 25 törzs hordozta. 6 *S. aureus* törzs két szuperantigén génjét is hordozta. Biofilm képzési tulajdonságot orrüregi törzsek 66,7%-a, torokból származó törzsek 79,5%-a, a bőrfelszínről izolált törzsek 47,5%-a mutatott.

Adataink nem támasztják alá azt a hipotézist, miszerint a *S. aureus* kolonizációja és szuperantigén termelésének szerepe van az atópiás dermatitis kialakulásában, ugyanakkor nem zárhatjuk ki a szerepüket a betegség lefolyásában.

KESERŰ JUDIT¹, GÁL ZSUZSANNA², KASZANYITZKY ÉVA³, JÁNOSI SZILÁRD³, SOMOGYI PÁL³, SZABÓ ISTVÁN¹

Csökkent meticillin érzékenységű humán és bovin eredetű *Staphylococcus aureus* izolátumok vizsgálata

¹DE Humán genetikai Intézet; ²Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Debrecen; ³Országos Állategészségügyi Intézet, Budapest

Bovin eredetű *Staphylococcus aureus* izolátumok rezisztencia karakterisztikáit hasonlítottuk össze humán törzsekével. Célunk az volt, hogy megállapítsuk, a bovin fertőzéseket okozó csökkent meticillin érzékenységű törzsek milyen jellegekben különböznek a hasonló humán törzsektől.

Korongdiffúziós módszerrel és E-tesztel rezisztensnek illetve borderline rezisztensnek bizonyult 28 bovin eredetű törzs oxacillin MIC értékeit makrodilúciós módszerrel határoztuk meg, önállóan, valamint klavulánsavval illetve szulbaktámmal kombinációban. A kapott értékek alapján úgy találtuk, hogy 3 törzs borderline meticillin rezisztens, 2 törzs esetében a MIC érték intermedier volt, de béta-laktamáz gátlók hatására nem csökkent, a többi törzs érzékenynek bizonyult oxacillinre. PBP2a-t egyik törzs sem termelt.

A bovin illetve a humán törzsekkel fágtypizálást is végeztünk. Megállapítottuk, hogy mindkét eredetű klasszikus BORSA törzsek az V. fágtypusba tartozó fágokkal tipizálódnak. A bovin eredetű törzsek esetében a 3 BORSA törzset nem tudtuk tipizálni a bovin típusú fágokkal, a többi igen.

SDS-PAGE segítségével megállapítottuk, hogy a klasszikus BORSA törzsek fermentlevegében egy nagyobb molekulatömegű (33 kDa), míg a membránfrakciókban egy, a kiválasztott enzimmal azonos és egy igen kicsi (12 kDa) molekulatömegű béta-laktamáz található, melyek mind az oxacillinnel indukált, mind a nem indukált mintában jelen voltak. A másik két bovin törzs fermentlevegé nem tartalmazott béta-

laktamázt, és a membránban is csak a kisebb mólsúlyú enzimet találtuk meg.

Mintáinkkal agardiffúziós tesztet is végeztünk. A BORSA törzsek esetében mind a fermentlevek, mind a membrán esetében tapasztaltunk oxacillináz aktivitást, mely indukáló hatású béta-laktám antibiotikummal növelhető volt. A másik két bovin törzs membránjának oxacillin bontása indukált állapotban is kisebb volt, mint a három BORSA törzsé, vagyis itt a rezisztenciáért főként intrinsíc mechanizmus felelős.

Összefoglalásul megállapíthatjuk, hogy a bovin eredetű BORSA törzsek az általunk vizsgált szempontokból nagyfokú hasonlóságot mutatnak a humán izolátumokkal, ami vagy a rezisztencia mechanizmusok transzferével, vagy a humán eredettel magyarázható.

KESZTHELYI ANDREA, KOVÁCS MÁRIA, PALATINUS ISTVÁN, BUZÁS ZSUZSANNA, KUCSERA JUDIT

***Filobasidium capsuligenum* IFM 40078 törzse által termelt killer toxin izolálása és tisztítása**

SZTE TTK Mikrobiológiai Tanszék, Szeged

A *Filobasidium capsuligenum* Rodrigues de Miranda comb. nov. IFM 40078 törzse killer toxint (FC-1) termel, amely az opportunista humán patogén élesztőgomba *Cryptococcus neoformans* mindhárom varietasa (var. *grubii*, var. *neoformans*, var. *gattii*) ellen hatásos (Kucsera et al. 2002). Munkánk célja e toxint termelő törzs pontosabb megismerése ill. a toxin tisztítása, biokémiai jellemzése, hatásmódjának felderítése.

A toxin termelődésének mértékét három különböző tápoldatban vizsgáltuk. Az YM4 (1% élesztőkivonat, 1,5% maláta, pH4 citrát-foszfát pufferben) tápoldatban termelődött a legrövidebb idő alatt a legnagyobb mennyiségű toxin, míg 2xYPD (1% élesztőkivonat, 2% pepton, 2% glükóz, pH4 citrát-foszfát pufferben) ill. különösen 2xYD (1% élesztőkivonat, 2% glükóz, pH4 citrát-foszfát pufferben) tápoldatban jelentősen kevesebb. Ezen tápoldatokban nevelt *Filobasidium capsuligenum* fermentleveiből fehérje kivonatot készítettünk, majd SDS-gélelektroforézissel elválasztottuk. Mindhárom esetben számos (6-8) fehérje sáv különült el, melyek közül egyik sem mutatott a toxin aktivitásának megfelelő intenzitásbeli különbséget. Ezért specifikusabb módszert dolgoztunk ki a toxin tisztítására, amely során az érzékeny *Cryptococcus neoformans* sejtek receptorához való kötődést használtuk ki. Mivel az így kapott oldat is több (6) fehérje sávot mutatott, toxint nem termelő k-mutánsokat indukáltunk UV-mutagenezissel, majd a termelő törzs ill. k- mutánsok fermentleveiből készített fehérje kivonatot választottuk el SDS-gélelektroforézissel. A termelő törzsnél megfigyeltünk egy olyan fehérje sávot (kb. 40 kD), mely a k- mutánsok esetén nem volt megtalálható. E sáv Western-blottját követő szekvenálás során kiderült, hogy valószínűleg két vagy több fehérjének felel meg. Ezért a toxin tisztításához még specifikusabb módszerre volt szükség. Feltételezve, hogy az FC-1 toxin más killer toxinokhoz hasonlóan rendelkezik sejtfallal receptorral, különböző sejtfallalkotó poliszacharidokhoz (kitin, mannán, pusztulán (β -(1-6)-glukán) és laminarin (β -(1-3)-glucan)) való kötődését teszteltük. Azt találtuk, hogy csak a pusztulán csökkentette szignifikánsan a toxin aktivitását. Így, e kötődést kihasználva, affinitás kromatográfiás módszerrel próbáltuk meg a toxin tisztítását. Sepharose 6B-hoz pusztulánt kötöttünk ligandként, majd erről az oszlopról biológiai aktivitást mutató frakciókat nyertünk. A toxinnak és hatásmechanizmusának részletesebb megismerése nagy előrelépést hozhat a mind több embert érintő cryptococcosis elleni terápiában, ahol közvetlenül felületi fertőzések esetén ill. közvetve anti-idiotipikus szerként kerülhetne felhasználásra.

Referenciák:

Kucsera J., M. Ohkusu, K. Takeo, I. Pfeiffer, J. Litter and F. Kevei (2002) *Filobasidium capsuligenum* IFM 40078 produces a toxin with anti-cryptococcal activity *Mycoses* **45** (Suppl. 2) 33

Munkánkat az OTKA TO35194 számú pályázata támogatta.

KESZTHELYI ANITA^{1,2}, KERÉNYI ZOLTÁN², POSTA KATALIN^{1,2}, HORNOK LÁSZLÓ^{1,2}

Transzkripciós profilok összehasonlítása egy, a párosodási típus génjében null-mutáns és a vad típusú törzs között a *Fusarium verticillioides*-ben (*Gibberella fujikuroi*)

¹SzIE Mezőgazdasági Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék MTA Mikológiai Kutatócsoport;

²Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő

A legtöbb heterotalliás tömlősgomba esetében a párosodási típust egyetlen lókuszt két idiomorf allélja (*MAT-1*, *MAT-2*) határozza meg. Az egyik idiomorf egy konzervatív α box domént, a másik pedig egy HMG (high-mobility-group) box domént tartalmaz. Csoportunk korábban végzett kísérletei igazolták, hogy azokban a *Fusarium*-fajokban is vannak ép párosodási típus gének, amelyeknek nincs, vagy nem ismerjük az ivaros alakját, s ezek a gének meg is nyilvánulnak a nemzetség minden eddig vizsgált "aszexuális" tagjában. A *MAT* gének mitotikus holomorf fajokban igazolt expressziója azt sugallja, hogy ezek a gének – amelyekről úgy tudjuk, hogy transzkripciós faktorokat kódolnak – egyéb géneket is szabályozhatnak, olyanokat, amelyek nem vesznek részt közvetlenül a párosodási folyamatban.

A *MAT* lókuszt által kódolt transzkripciós faktorok feltételezett célgénjeinek azonosítására *MAT-2⁰* mutánsokat hoztunk létre *hph* (higromicin-foszfortranszferáz) kazetta transzformációval történő beépítésével. Négy kettős rekombinációt hordozó transzformánst találtunk. Ezekben a törzsekben Southern hibridizációval és PCR vizsgálatokkal bizonyítottuk a *MAT-2* gén sikeres inaktiválását.

cDNS-AFLP vizsgálattal kerestük azokat a géneket, amelyek kifejeződése csökkent a *MAT-2⁰* mutánsokban. Kizárólag a vad típusban felszaporozódott fragmentumokat klónoztuk, az expressziós különbségeket Northern hibridizációval ellenőriztük, s az ígertes fragmentumok nukleotid sorrendjét meghatároztuk. A CT/CG1 klón a *Gibberella fujikuroi*-ból származó, nitrogén anyagcserét gátló fehérjével 45 %-os, a GC/AG1 az *Aspergillus fumigatus*-ból ismert cullin komplex fehérjével 76%-os, míg a GC/TG1 klón a *Neurospora crassaban* kimutatott cisztationin gamma szintázal 80%-os homológiát mutat. Különös figyelmet érdemel az a tény, hogy a *MAT-2⁰* mutánsokban a nitrogén anyagcsere szabályozásában résztvevő gének kifejeződése csökkent, hiszen ismert tény: a nitrogénhiány a protoperitéciumok megjelenését indukálja a *N. crassaban*.

(A kutatást az OTKA T34735 és T43221 pályázatok támogatták.)

KESZTHELYI SÁNDOR

A kukoricamoly (*Ostrinia nubilalis* Hübner) kártétele

Kaposvári Egyetem ÁTK Növénytani és Növénytermesztéstani Tanszék, Kaposvár

A kukoricamoly (*Ostrinia nubilalis* Hübner) lárvája jelentős károkat okoz a kukorica-termesztésben mind hazánkban, mind külföldön. A termésveszteség 68%-os töfertőzöttség mellett elérheti a 20 százalékot is.

A kártevő egyedszámának csökkentésére több megoldás született. A környezetvédelem nézőpontjából a természetes ellenségekkel történő populáció csökkentés tűnik a legésszerűbb megoldásnak.

Vizsgálataim célja az volt, hogy a megtudjam mely fajok és milyen arányban parazitálják a Somogy megyei Somogyuszil település kukoricamoly populációját. Ennek érdekében 2000, 2001 őszen 4x100 károsított növényt gyűjtöttem be egy 100 ha-os kukoricatábláról. A bábparazitoidok kinevelése és meghatározása céljából, ezen évek tavaszain egy, 5 ha-os tábláról 100-100 molyos tövet raktam zsákos futtatóba és helyeztem szabadföldi inszektáriumba.

Az eredmények szerint a *Lydella thompsoni* (Herting, 1959) fürkészlégy (parazitálási %=11,25), és a *Sinophorus alkae* (Ellinger et Sachtleben, 1928) fürkészdarázs (parazitálási %=4,87) bizonyult a területen található kukoricamoly populáció jelentősebb parazitoidjainak. Kisebb mértékben, de sikerült bizonyítani a *Sympiesis viridula* (Thomson, 1878) (parazitálási %=0,62), *Phaeogenes nigridens* (Wesmael, 1845) (parazitálási %=1) és *Bracon sp.* (parazitálási %=0,12) fürkészdarázsak jelenlétét.

A két évig végzett vizsgálatokból kiderült, hogy a parazitoidok és a kukoricamoly lárvák egyedszám változása hasonlóan alakult, tehát a parazitoidok mennyiségi növekedése összefügg gazdaállatuk felszaporodásával.

A vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a *Lydella thompsoni* és a *Sinophorus alkae* fajok parazitoid tevékenysége a kukoricamoly populáció egyedszámával összefüggésben jelentkezik. Ezek a fajok

együttesen 11-18-szor annyi lárvát pusztítanak el, mint a többi faj együttvéve.

KIS ZOLTÁN^{1,3}, SAS KATALIN², ENDRÉSZ VALÉRIA³, BURIÁN KATALIN³, PETROVAY FRUZZSINA¹, NAGY ÁGNES⁴, KAPUSINSZKY BEATRIX¹, GYULAI ZSÓFIA³, VESZELY GIZELLA⁴, MÁNDI YVETTE³, VÉCSEI LÁSZLÓ², BERENCSI GYÖRGY¹, GÖNCZÖL ÉVA¹

Perzisztens fertőzések szerepe a stroke kialakulásában

¹Johan Béla OEK Virologiai Főosztály, Budapest; ²SZTE Neurológiai Klinika; ³SZTE Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet, Szeged; ⁴Magyar Honvédség Központi Katonai Kórháza, Budapest

A hagyományos rizikó faktorok, magas vérnyomás, hiperlipidémia, diabetes mellitus dohányzás, érrendszeri betegségek a stroke kialakulásának csak egy részét magyarázzák. Bizonyos krónikus fertőzésekről, pl. Chlamydia pneumoniae, humán cytomegalovírus (HCMV), herpes simplex vírus (HSV), is feltételezik, hogy növelik a stroke kialakulásának kockázatát. A monocyták aktivációjának és az aktivált monocyták által termelt termékeknek, pl. az IL-8 kemokinnek is szerepe lehet a stroke pathogenezisében. A HCMV, ezen belül a HCMV-igen-korai fehérjék erős IL-8 induktorok. Esetkontroll tanulmányunkban 59 stroke-on frissen átesett beteget és 36 kontroll egyént vizsgáltunk meg. A klasszikus rizikó faktorok közül a diabetes mellitus a tanulmányból kizáró ok volt. A kontroll csoportban kardiális betegség és asthma bronchiale előfordulásáról nem tudunk. A vérminta vétele a stroke kialakulását követően 2 héten belül történt. A Chlamydia pneumoniae, HCMV, Epstein-Barr vírus (EBV), human herpesvírus 6 (HHV6), HSV ellenanyagokat ELISA módszerrel határoztuk meg. Az ellenanyagok szintjének megállapítása az OD értékek beosztása alapján történt. A C. pneumoniae ompA DNS-t és a 5' NTR-régió specifikus enterovírus RNS-t, valamint az IL-8 promotor polimorfizmust PCR módszerrel a teljes vérből határoztuk meg. A nem, dohányzás, hiperlipidaemia, alkohol fogyasztás, dohányzás tekintetében nem volt különbség a beteg és kontroll csoport között. A beteg és kontroll csoport egyéneinek életkora 32-65 év volt, de az egyenlőtlen kor megoszlás miatt a két csoport között kor szempontjából szignifikáns különbséget mértünk (p=0.015). A magas vérnyomásban szenvedők nagyobb számban fordultak elő a beteg csoportban, mint a kontrollokban.

KISKÓ GABRIELLA¹, *MOHÁCSINÉ FARKAS CSILLA¹, BUJNA ERIKA², REZESSYNE SZABÓ JUDIT², MARÁZ ANNA¹

Patogén baktériumok túlélésének vizsgálata bifidobaktériummal erjesztett sárgarépa lében

¹BCE Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék; ²Sör- és Szeszipari Tanszék, Budapest

Napjainkban egyre keresettebbek a tartósítószeret nem tartalmazó, természetes alapanyagokból készült, kíméletesen feldolgozott, biztonságos élelmiszerek. Kísérleteink célja az volt, hogy bifidobaktériummal erjesztett sárgarépa lé előállításának mikrobiológiai kockázatát meghatározzuk. A nyers és pasztörözött sárgarépa lé mintákat mesterségesen fertőztük *Escherichia coli* közönséges (ATCC 8739) és O157:H7 törzseivel, valamint *Yersinia enterocolitica* OKI 98001 törzsszel.

Az *E. coli* közönséges törzsszel való mesterséges beoltás esetén a fermentáció kezdetén a baktérium szaporodása volt megfigyelhető: 24 órás fermentációs idő alatt a sejtkoncentráció 2 nagyságrenddel nőtt. Ezt követően a sejtek pusztulását tapasztaltuk, azonban még 48 óra alatt sem csökkent a sejtkoncentráció a kimutathatósági határ alá. Az *E. coli* O157:H7-es törzs érzékenyebbnek bizonyult, mint a közönséges *E. coli* törzs: 24 órás erjesztési idő alatt lényegesen lecsökkent a koncentrációja, annak ellenére, hogy az első 16 órás erjesztési idő alatt mintegy 100-szoros sejtszám növekedést tapasztaltunk. A *Yersinia enterocolitica* törzs lényegesen érzékenyebb volt a környezeti változásokra, mint az *E. coli* törzsek. Mind a nyers, mind a pasztörözött sárgarépa lében koncentrációja a fermentáció 24. órájára a kimutathatósági határ alá csökkent. Érdekes módon a nyers sárgarépa lében vitalitása jobb volt, mint a pasztörözöttben.

Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a nyers sárgarépa lé bifidobaktériumos erjesztése során a kiindulási mikrobiótában esetlegesen jelenlévő *E. coli* és *Yersinia enterocolitica* sejtek potenciális veszélyt jelentenek a fogyasztóra, mivel a bifidobaktériumos fermentáció során hosszú ideig túlélnek, sőt az *E. coli* sejtek még szaporodni is képesek. Mikrobiológiai biztonsági szempontból tehát szükséges a répalé pasztörözése vagy sterilizése a bifidobaktériummal történő beoltást megelőzően. A gyártástechnológiai folyamat során utófertőzés szempontjából ugyancsak veszélyt jelenthetnek ezek a baktériumok, ezért a higiéniai szabályok betartása és megfelelő (biztonságos) technológiai kidolgozása

szükséges.

Ehhez a munkához az Oktatási Minisztérium az NKFP-4/0028/2002. számú projekt keretében támogatást nyújtott, amiért ezúton is köszönetet mondunk.

KISS LÁSZLÓ

Glikozidáz enzimek működési mechanizmusának vizsgálata

DE TTK Biokémiai Tanszék, Debrecen

A szénhidrátok egyedülálló szerepet töltenek be a természetben. Ezen vegyületek szerkezeti és funkcionális változatossága sokkal nagyobb, mint a hasonló méretű peptidek, illetve nukleinsavak esetében lehetséges. Ezért játszanak az oligo- és poliszacharidok központi szerepet megannyi biológiai folyamatban. Ennélfogva az enzimek, melyek ezeket a molekulákat hidrolizálják - a glikozidáz enzimek - az élő szervezetben számos biológiai folyamatban vesznek részt. Kiemelkedően fontos szerepük van a cellulóz, a természetben legnagyobb mennyiségben előforduló növényi biomassza glükózzá történő lebontásában, ezzel lehetővé téve környezetbarát és gazdaságos etanol gyártási technológia kidolgozását. Ez, mint megújuló energiaforrás nagy jelentőségű a jövő energiatermelés szempontjából. Két, ebből a szempontból nagy jelentőségű enzim példáján mutatom be a működési mechanizmus vizsgálati módszereket. Ez a két enzim az *Aspergillus carbonarius*-ból izolált β -D-glikozidáz és β -D-xilozidáz. A vizsgálatokban specifikus kémiai módosításokat, valamint aktív centrum specifikus inhibitorokat és inaktivátorokat, "affinity label"-t alkalmaztunk.

KÓNYA JÓZSEF, SZALMÁS ANITA

Humorális és celluláris immunitás rekombináns humán papillomavírus antigének ellen

DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Debrecen

HPV16 genomot hordozó, cervix carcinoma eredetű Caski sejtekből PCR technikával felszaporítottuk az E6 ORF-et, majd beklónoztuk Xa2 bakteriális fúziós protein vektorba. A beépülés irányultságát direkt Western Blot technikával határoztuk meg. Sense irányultság esetén kb. 25 kDa molekulatömegű fúziós protein terméket kaptunk.

A rekombináns antigén virális részére az expressziója során a gazdasejt (*E.coli* XL-1 törzs) biotint kötött. A biotínált vírus antigént tartalmazó fúziós proteint affinitás kromatográfiával SoftLinkTM gyantához kötöttük, majd aktivált rekombináns X. véralvadási faktorról lehasítottuk róla a virális részt, melynek aktivitását IgG-specifikus ELISA módszerrel vizsgáltuk betegszérumokban.

A vizsgált szérumok három betegcsoportból származtak: 27 citológiai atypias betegtől, akik közül 9 beteg HPV16 genotípussal volt fertőzve. A második betegcsoportba HPV-16 pozitív cervix carcinomás betegek tartoztak (17 beteg), a harmadikba pedig egyéb HPV genotípusokkal fertőzött cervix carcinomás betegek (6 beteg).

Az első betegcsoportban valamennyi HPV16 pozitív beteg szérumát vizsgálva pozitív eredményt kaptunk, más HPV típusokkal fertőzöttek szérumai esetén 18 mintából 11 adott pozitív eredményt. A HPV16 pozitív cervix carcinomás betegek szérumai közül 16-nak volt E6 specifikus ellenanyaga.. Az egyéb HPV típusokkal fertőzött betegek esetében 6 szérum közül 2 bizonyult reaktívnek.

Megállapíthatjuk, hogy az általunk előállított rekombináns HPV antigén fennálló HPV-16 fertőzés esetén 94-100 %-ban mutatott ki keringő vírusellenes IgG ellenanyagokat. Az egyéb HPV típusokkal fertőzöttek esetében a reaktivitás lehetséges okai között szerepelhet keresztreakció más HPV genotípusok homológ epitópjaival, esetleg korábbi HPV16 fertőzés jelét észleltük. A celluláris immunológiai vizsgálatokat interferon-gamma és interleukin-4 ELISPOT módszerrel végezzük.

KOÓSZ ZSUZSA¹, *GAZDAG ZOLTÁN¹, MIKLÓS IDA², SIPICZKI MÁTYÁS², BERENTÉNÉ BENE JUDIT³, KOMLÓSI KATALIN³, HAVASI VIKTÓRIA³, MELEGH BÉLA³, PESTI MIKLÓS¹

A glutation reduktáz enzim és a pap1 transzkripció faktor szerepe a Cr(VI) toleranciában a *Schizosaccharomyces pombe*-nél

¹PTE TTK Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék, Pécs; ²DE TTK Genetikai és Molekuláris Biológiai Tanszék, Debrecen

Célunk a *Schizosaccharomyces pombe* krómtoleráciájáért felelős gén azonosítása, jellemzése, a Cr(VI) hatásmechanizmusának megismerése. Korábbi eredményeink alapján feltételezzük, hogy a Cr(VI)-al szembeni tolerancia kialakulásában jelentős szerepe van az antioxidáns enzimeknek, a glutation anyagcserében résztvevő molekuláknak, kiemelten a glutation reduktáz (GR) enzimnek és a sejtben képződő hidrogénperoxidnak. Azt tapasztaltuk, hogy a GR megnőtt illetve csökkent specifikus aktivitása korrelál a szenzitivitással ill. toleranciával [1]. Feltételezésünk bizonyításaként először a GR gén transzformációját végeztük el. A transzformációt a PUR18 (ura+) vektorral végeztük és szelektáltunk ura--os Cr(VI) toleráns vonalra. Ezért a lizin auxotróf Cr(VI) toleráns chr1-66T törzset kereszteztük az uracil auxotróf 90chr+ törzssel, majd az így létrejött chr1-663T törzset transzformáltuk a GR génnel. A transzformáció hatására a vizsgált három transzformáns Cr(VI)-al szemben érzékenyebbek bizonyultak, mint a kiinduló törzs, a CR(VI) minimális gátló koncentráció (MIC) a transzformánsok esetében 225 µM volt, míg a kiinduló törzs esetében 250 µM. Ez bizonyítja a GR fontos szerepét a Cr(VI)-al szembeni toleranciában. A plazmid stabilitási teszt azt mutatta, hogy a plazmid nem épült be a genomba. A GR enzim aktivitás növekedése 0-40 % közötti volt a transzformánsokban a kiinduló törzshöz képest. Megmértük a törzsek peroxidkoncentrációját, a transzformánsok esetében 3-4-szeres koncentrációnövekedést kaptunk a chr1-663T törzshöz képest. Annál a transzformánsnál, ahol szignifikánsan magasabb a GR aktivitás, a legmagasabb az intracelluláris peroxidkoncentráció, valamint a Zn²⁺ MIC a szülőinek a kétszerese. Ezeknek az eredményeknek a tisztázása további méréseket igényel (kataláz és SOD-ok aktivitása, glutation koncentráció). Ezzel párhuzamosan elvégeztük szülői törzs 6chr+, az ebből létrehozott Cr(VI) toleráns a mutáns chr1-66T és a chr1-663T törzs GR szekvenciaanalízisét, ami nem mutatott eltérést a törzsek szekvenciái között. Ezért folyamatban van a Pap1 transzkripció faktor szekvenciaanalízise, mivel ez a gén nagyon sok antioxidáns enzim és fehérje átírásának szabályozásában felelős (GR, kataláz, tioredoxin, tioredoxin reduktáz), megváltozása okozhat változást a CR(VI)-al szembeni toleranciában. Ha nem a GR enzimet és nem a Pap1 transzkripció faktort érintette a Cr(VI) tolerancia fenotípusáért felelős mutáció, akkor annak azonosítására tervezzük a chr1-663T törzset génkönyvtárral transzformálni, mivel a chr1-663T törzs egy génben sérült, ezért az indirekt szelekcióval kiemelhető az a transzformáns, amely tartalmazza a javító gént.

1. Gazdag, Z., Pócsi, I., Belágyi, J., Emri, T., Blaskó, Á., Takács, K. and Pesti, M. (2003) Chromate tolerance caused by reduced hydroxyl radical production and decreased glutathione reductase activity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Basic Microbiology* 43, 96-103.

KOVÁCS IDA JUSZTINA¹, HEGEDŰS KATALIN¹, PÁL ATTILA², PUSZTAI ROZÁLIA¹

Gyulladásos cytokinek szerepe a cytomegalovírus transzplacentáris terjedésében

SZTE ¹Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet; ²Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Szeged

A nők terhesség alatti primér cytomegalovírus (CMV) fertőzése az esetek 40%-ában átterjed a magzatra. Kevésbé ismertek a CMV transzplacentáris terjedésben szerepet játszó faktorok.

Meghatároztuk congenitalis CMV fertőzésből származó, különböző gB genotípusú izolátumok és a Towne laboratóriumi törzs (gB1) gyulladásos cytokinek (TNF- α , IL-1 β , IL-6 és IL-8)-et indukáló képességét syncytiotrophoblast (ST) tenyészetekben. Vizsgáltuk a képződött cytokinek mennyisége és az igen korai CMV gén kifejeződésének gyakorisága közötti kapcsolatot. történt. A CMV igen korai géntermék kimutatását monoklonális ellenanyaggal, immunfluorescens módszerrel végeztük.

Egyedi placentákból izolált cytotrophoblastok differenciáltatásával nyert ST tenyészeteket fertőztünk a CMV törzsekkel, a képződött cytokinek értékmérése ELISA kitékkel

A különböző gB genotípusú törzsekkel, azonos multiplicitással fertőzött ST-okban a vírus igen korai génkifejeződésének mértéke a törzsek többségében a laboratóriumi (Towne) törzshöz hasonló mértékű

volt. A 20 jelű törzssel fertőzött tenyészetben 10-szer, a 128V jelűvel pedig 200-szor több sejt magjában volt igen korai géntermék. Sem a kontroll, sem a fertőzött sejtek tápfolyadékában TNF- α és IL-1 β nem volt kimutatható mennyiségben. IL-6-ot a vizsgálat mindegyik időpontjában (6, 24, 48, 72 és 96 óra) a kontroll tenyészetéhez hasonló szintben találtunk a laboratóriumi (Towne) törzsszel és a legtöbb izolátummal fertőzött tenyészet tápfolyadékában. A 128V jelű törzs nagyobb mennyiségű IL-6 képződését indukálta. A többi törzstől eltérően a 128V és a 20 jelű törzsek nagy mennyiségű IL-8 termelését indukálták.

A vizsgálat eredményei azt mutatják, hogy a CMV törzsekkel fertőzött ST tenyészetekben a képződött IL-8 mennyiségével összefügg a vírus igen korai génjét expresszáló sejtek száma. Ismerve, hogy az IL-8 számos sejtfejlésben fokozza a CMV szaporodását, feltételezzük, hogy a nagymennyiségű IL-8-at indukáló törzsek megteremtik maguknak a szaporodásukhoz és a placentában való terjedésükhöz szükséges optimális viszonyokat. Az alacsony szintű IL-8-at indukáló törzsek esetenként pedig más úton biztosították a szaporodás és a terjedés. Így a ST-ban latensen jelenlévő CMV szaporodásához az IL-8-at biztosíthatja egy felülfertőző vírus, mint a humán immundeficiencia vírus vagy a humán herpesvírus-6, esetleg olyan baktériumok, amelyek IL-8 termelést indukálnak, mint az *E. coli*, vagy a *B. fragilis*.

A vizsgálatokat az OTKA T-26442 számú és az Oktatási Minisztérium FKFP 113/2000 számú támogatásával végeztük.

KOVÁCS L. KORNÉL^{1,2}, BAGI ZOLTÁN¹, BÁLINT BALÁZS^{1,2}, BALOGH JUDIT^{1,2}, DÁVID RÉKA¹, CSANÁDI GYULA¹, KOVÁCS T. ÁKOS^{1,2}, LATINOVICS DÓRA¹, MARÓTI GERGELY^{1,2}, MÉSZÁROS LÍVIA^{1,2}, PEREI KATALIN¹, TAKÁCS MÁRIA^{1,2}, TÓTH ANDRÁS^{1,2}, RÁKHELY GÁBOR^{1,2}

Stratégiák a jövő energiaforrásainak mikrobiális előállítására

¹SZTE Biotechnológiai Tanszék; ²SZBK Biofizikai Intézet, Szeged

Közismert, hogy az emberiség gazdaságosan kitermelhető energiaforrásai kimerülőben vannak, ezért egyre nagyobb az érdeklődés alternatív, megújuló energiaforrások iránt. A legtisztább energiahordozó a hidrogén, ennek előállítására több biológiai eljárás látott napvilágot.

Hidrogén elvben termelhető fotoszintetikus élőlényekkel a fényenergia közvetlen hasznosításával. Alternatív, két lépéses megközelítésben a fényenergiát először biomasszává alakítjuk pl. energianövények segítségével, s ebből fermentatív mikroorganizmusokkal fejlesztünk hidrogént. Hidrogén termeltetése lehetséges megfelelően előkezelt olyan szerves hulladékból is, amely környezetünkre ártalmas, vagy nehezen bontható komponenseket tartalmaz.

A biohidrogén termelésének kulcsenzime a hidrogenáz. Mind a fotoszintetikus bíbor kénbaktérium, *Thiocapsa roseopersicina* BBS, mind a fermentatív hipertermofil archaebaktérium, *Thermococcus litoralis* több NiFe hidrogenázt tartalmaz. Ezen enzimek segítségével a törzsek képesek hidrogén termelésére illetve a hidrogén oxidációjára. A termelt hidrogén tisztítás után a felhasználásig tárolható, majd elektromos árammá alakítható. A hidrogén oxidációja során felszabaduló elektronok pl. energia cellákban vagy különféle redukzív folyamatokban kerülhetnek felhasználásra.

Alternatív energiahordozó a biogáz, melynek fő komponense a metán. A kommunális szerves hulladékok illetve biomassza erjedéséből származó biogáz képződése összetett folyamat, amely egy mikrobiális konzorcium kombinált metabolikus tevékenységének végeredménye. A biogáz termelése, mint redukzív folyamat felgyorsítható hidrogéntermelő mikroorganizmusok adagolásával, ezáltal a biogáz előállításának gazdaságossági mutatói jelentősen javíthatók.

KOVÁCS LÓRÁND, CSANÁDI ÁGNES, ZAJA ANIKÓ, MICZÁK ANDRÁS

CAFA protein a *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 törzsből

SZTE Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet, Szeged

A "cytoplasmic axial filament A" (CafA) fehérjét a kromoszóma szegregációban és a sejtosztódásban betöltött szerepe alapján azonosították *Escherichia coli*-ban. Az RNase E N-terminális, katalitikus szakaszával mutat szekvencia homológiát. A CafA protein RNase E-hez hasonló endoribonukleáz aktivitással is rendelkezik, ezért nevét RNase G-re változtatták. A prokarióta és eukarióta fajok nagy

részében található gének, melyek az *E. coli* RNase E és/vagy G fehérjékhez hasonló szekvenciájú ismert vagy feltételezett fehérjéket kódolnak. Meglepő, hogy a Caf/RNase G homológ jelen van a *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 törzsből, de hiányzik egy másik szekvenált törzsből, a H37Rv-ből. Ebben RNase E található, hasonlóan, mint a *M. bovis*-ban. Ebben a tekintetben a *M. tuberculosis* H37Rv törzs megegyezik a *M. bovis*-sal és eltér a fajon belüli CDC1551 törzstől. A mycobacterium RNase G 100 % homológiát mutat a H37Rv és a *M. bovis* RNase E C-terminális felével. A munka során a *M. tuberculosis* CDC1551 caf gént klónoztuk és *E. coli*-ban és *M. bovis* BCG-ben fejeztük ki. A fehérje 621 aminosavból áll (GenBank accession no. MT2520). A számított molekulatömege 67 kDa, de SDS poliakrilamid gélen ennél nagyobb fehérjeként vándorol. Tisztításakor a baktériumokat üveggyöngy segítségével tártuk fel és a fehérjéket anti-FLAG oszlopon választottuk el. A poliakrilamid gélen vizsgált tisztított mintákban egyéb fehérjéket is találtunk, melyek azonosítása tömegspektrográfias vizsgálattal történt. Az *E. coli*-ban kifejezett RNase G-hez főleg riboszómális fehérjék kapcsolódtak. Ha az RNase G preparátumot *M. bovis* BCG-ből nyertük, akkor két RNase G asszociált fehérje volt azonosítható. Az egyik fehérje az Mb0825c gén terméke (ez a gén 100 %-ban megegyezik a *M. tuberculosis* CDC1551 MT0822 és a H37Rv Rv0802c génjével) és egy acetiltranszferáz. A másik fehérje a polifoszfát/ATP-NAD kináz csoportba tartozik, génje mindhárom törzsből megegyezik (*M. bovis*: Mb1721; *M. tuberculosis* CDC1551: MT1734; H37Rv: Rv1695). Ezeket a fehérjéket azonosítottuk akkor is, amikor a mycobacterium RNase E-t *M. bovis* BCG-ben fejeztük ki. A tisztított RNase G készítmények endoribonukleáz aktivitásának vizsgálata mycobacterium riboszómális RNS segítségével történt, valamint olyan RNS-ek használatával, melyek az *E. coli* RNase G ismert szubsztrátjai.

A munkát az OTKA támogatás tette lehetővé. Témaszám:034820

KOVÁCS M. GÁBOR¹, ANDREW J. DAVISON², ALEXANDER N. ZAKHARTCHOUK³, HARRACH BALÁZS¹

Óvilági majomból izolált két adenovírus szerotípus (SAdV-1, SAdV-3) teljes genom-szekvenciája

¹MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet, Budapest; ²MRC Virology Unit Institute of Virology, Glasgow, UK;

³University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada

Az Adenoviridae család tagjai burok nélküli, ikozaéderes szimmetriájú, kétszálú DNS vírusok, melyek a gerincesek minden fontosabb csoportjában előfordulnak. Öt fő monofiletikus csoportjuk közül négy hivatalosan elfogadott nemzetsége a családnak. Egyes csoportjait a családnak – például a humán adenovírusokat (HAdV) – alaposan vizsgálták, mivel például génkifejező rendszerek fejleszthetők belőlük. Ezzel szemben a nem emberszabású majmokban izolált adenovírusokra vonatkozóan viszonylag kevés adat áll rendelkezésünkre. A majmokban izolált, kb. 30, törzsgyűjteményben is elérhető adenovírus szerotípus (SAdV) közül mindösszesen 5 csimpánzból származónak volt ismert a teljes genom-szekvenciája. Korábban megkezdett, és ezen a fórumon is bemutatott majom-adenovírus genomikai vizsgálataink folytatásaként két óvilági majomból izolált szerotípus (SAdV-1 és SAdV-3) teljes genomjának szekvenálását és elemzését tűztük ki célul. A vizsgált vírusok az Amerikai Típustörzs Gyűjteményből (ATCC) származtak. Szaporításuk és a virális DNS kivonása után a genom-szekvenálást „shotgun” módszerrel végeztük. Mindkét szerotípus teljes genomját sikerült meghatározni. A SAdV-1 genomja 34.450 nukleotid hosszú, G+C tartalma 55,21 %, a SAdV-3 34.246 nukleotid hosszú, G+C tartalma pedig 55,25%. A G+C tartalom mindkét genomnál hasonló génenkénti, genomrészenkénti heterogenitást mutat. A SAdV-1 és 3 genomok szerveződése hasonló a HAdV genomoknál leírtakhoz. Mindkét szerotípusnak egy VA-RNS génje van, az E3 régióban mindkettő 6 feltételezett gént kódol, hasonlóan az E4 régiójukhoz. Fontos jellemző, hogy míg a SAdV-3-nak egy fiber génje van, addig a SAdV-1 két fiber génnel rendelkezik – hasonlóan a SAdV-15 és SAdV-11-hez és a HAdV-40 és 41-hez. A filogenetikai vizsgálatok során a két szerotípus a jelenleg elfogadott hat humán adenovírus fajhoz hasonlítva korai leágazásokat képeznek – hasonlóan a HAdV-A és HAdV-F fajokhoz. Habár a SAdV-1 majdnem minden gén geneológia alapján monofiletikus a HAdV-F-fel, a filogenetikai távolságok viszont olyan jelentősek, hogy mind a SAdV-1, mind pedig a SAdV-3 önálló leágazásnak tekinthető, és nem illeszthetőek be a hat meglévő humán adenovírus faj egyikébe sem.

A munkákat támogatta a FEMS, az MRC, a MeH és az OTKA (T043422).

KOVÁCS MÓNICA, MARÁZ ANNA

A sejtfelületi hidrofobicitást befolyásoló környezeti tényezők vizsgálata biofilmképző élesztőknél
BCE Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék, Budapest

A hártvaképző borélesztő törzsek sejtjei a magas etanol tartalmú száraz borok felszínén összekapcsolódva biofilmet alakítanak ki. A hártvakában lévő sejtek ezen borok biológiai érése során a borban található etanolt és/vagy glicerint oxidatív metabolizmus révén hasznosítják. Legismertebb ilyen hártva alatt érlelt bor a sherry, azonban egyre inkább bebizonyosodik, hogy a Tokaji száraz szamorodni érlelésében, megfelelő minőségű bor kialakításában is fontos szerepet kapnak a hártvaképző élesztőgombák.

Kutatómunkánk során tanulmányoztuk az erjeszhető (glükóz és fruktóz) és a nem erjeszhető (glicerín és etanol) szénforrások hatását a sejtek szaporodására és a hártvaképzésre, összehasonlítva nem hártvaképző borélesztő törzsekkel.

A glükóz represszió egyik hatása, hogy jelenléte gátolja a nem erjeszhető szénforrások hasznosítását az aerob légzési rendszer gátlása révén. A *Saccharomyces cerevisiae* törzsek különösen érzékenyek erre, már 0,5 % alatti glükóz is megakadályozza a nem-erjeszhető szénforrások hasznosítását. Ez a magyarázata annak, hogy az élesztő hártva csak száraz szamorodni felületén képes kialakulni, amelyeknél a cukor koncentráció 5 mg/ml alatt van. Ennek ellenére sikerült édes szamorodni felszínéről (ahol a cukor koncentráció magasabb, mint 55 mg/ml) is izolálni hártvaképző élesztőgombákat, amelyeket szintén bevontunk a vizsgálatokba.

Eredményeink szerint a hártvaképző borélesztő törzsek jól szaporodtak és fejlett hártvakat képeztek glükózt és fruktózt, mint egyedüli szénforrást tartalmazó tápközegeken, valamint glükóz-etanol és fruktóz-etanol azonos arányú keverékein, míg etanolt és glicerint, mint egyedüli szénforrást tartalmazó tápközegeken fermentatív körülmények között nem voltak képesek szaporodni. Leggyengébb szaporodást és filmképzést glükóz-glicerín és fruktóz-glicerín szénforrások keverékén tapasztaltunk. A glükóz koncentráció emelése a sejthozam csökkenését eredményezte, a növekedés 80 mg/ml glükóz koncentráció esetében, pedig szinte teljesen gátolt volt.

Vizsgáltuk továbbá a hártvaképző borélesztő törzsek sejtfelületi hidrofobicitását a szaporodás és a hártvaképzés alatt, valamint különböző pH értékek esetében, átfogva a savas és a lúgos pH tartományt. A hidrofobicitást a MATH teszt segítségével határoztuk meg. A hártvaképző törzsek erősen hidrofóboknak bizonyultak ($MATH < 2$). Különböző pH értékeknél a törzsek eltérő hidrofobicitási tulajdonságokat mutattak, magas pH értékek (7 és 9) esetében, pedig elvesztették hidrofób jellegüket, hidrofíllé váltak. A nem hártvaképző borélesztő törzsek sejtjei minden vizsgált pH értéknél hidrofílnak bizonyultak ($MATH > 2$).

KOVÁCS RÓBERT, CSIKOR ZSOLT, MIHÁLTZ PÁL

A termofil aerob szennyvíziszap-stabilizáció kinetikájának vizsgálata a hőmérséklet függvényében
BME VMK Vegyipari Műveletek Tanszék, Budapest

Az önhevíítő aerob termofil szennyvíziszap-stabilizáció hosszú távon is fenntartható megoldást kínál a napjainkban egyre súlyosabbá váló szennyvíziszap-problémára, hiszen a stabilizáló reaktorban dolgozó termofil aerob mikrobakultúra a beadagolt szennyvíziszapot stabil, akár a mezőgazdaságban talajjavítószerként is hasznosítható terméké alakítja. Mind a mai napig nagyon kevésbé ismertek azonban a stabilizáló reaktorban lejátszódó folyamat részletei; kutatócsoportunk e folyamat kinetikájának, illetve az esetleges intenzifikálási lehetőségek feltárásán dolgozik.

Munkánk első lépését a stabilizálási folyamat konstans hőmérsékleten (55°C) végzett vizsgálata jelentette, melynek eredménye az ASM-modellcsaládon alapuló, azt a termofilek lassú aktiválódásával kiegészítő matematikai modell lett (Miháلتz és mtsai, 2003). Jelen munkánkban ezekre az alapokra építkezve a stabilizáló reaktorban lejátszódó folyamatok hőmérsékletfüggését vizsgáljuk, mely többek között hozzásegíthet minket a stabilizálatlan iszap reaktorba táplálását követő néhány óra eseményeinek (a reaktor felmelegedése a környezeti hőmérsékletről a szokásos 40-60°C-os üzemi hőmérsékletre) részletes megértéséhez.

Konstans hőmérsékletű iszapstabilizálási tesztekét végeztünk, melyek során 20, 25, 30, 35, 40, 50 és

60°C-os csapvízhez tápláltuk a stabilizálandó iszapot; a lebontást légzés- illetve KOI-méréssel követtük.

hőmérséklet	μ_{\max}	b_H	$\mu_{\max} \cdot b_H$
mezofil			
20	6.0*	3.0*	3.0*
	8.85	1.54	7.31
30	17.59	2.80	14.79
termofil			
40	18.04	3.02	15.02
50	24.32	5.23	19.09
60	24.44	7.42	17.02

1. táblázat. A növekedési (μ_{\max} , 1/d) és pusztulási sebesség (b_H , 1/d) a hőmérséklet (°C) függvényében (* az ASM1 szerzői által 20°C-ra megadott értékek)

A respirogramok és a KOI-adatok alapján elvégeztük az aktiválódással kiegészített ASM1 modell kalibrálását. A modell minden esetben jól illeszkedett a kísérleti adatokra. Megfelelően írta le a mezofil esetben a betáplálást követő mikrobanövekedést, illetve a szubsztrátfogyás utáni pusztulást (a kalibrálás eredményeként kapott paraméterkombináció nem tért el jelentősen az ASM1 szerzői által megadott tipikus értékektől, l. az 1. táblázatot); a termofil respirogramokon a betáplálást követő azonnali légzéscsökkenést jól megmagyarázza a stabilizálandó iszapban található mezofil kultúra pusztulásával, illetve az ezt követő intenzív légzési szakaszt a termofilek aktiválódásával. Az 1. táblázat utolsó oszlopában szereplő $\mu_{\max} \cdot b_H$ különbség jó tájékoztatást nyújt a mikroorganizmusok aktivitásáról az egyes hőmérsékleteken; ezekből az adatokból látható, hogy a termofil zónában mintegy kétszer-háromszor gyorsabb lebontás folyik, mint a tipikus mezofil hőmérsékleteken (20°C). A $\mu_{\max} \cdot b_H$ értéknek a termofil tartományban maximuma van 50°C-on; ez a tény, valamint az, hogy a modell szintén ezen a hőmérsékleten jósolja leggyorsabbnak a termofil aktiválódást, azt jelzi, hogy a termofilek számára e hőfok környéke az optimális.

Miháltz, P., Kovács, R., Csikor, Zs.: Degradation rates in thermophilic sludge processing – the liquid and the solid way; International Conference - Biosolids 2003: Wastewater Sludge as a Resource, Trondheim, Norway, 23-25 June 2003.

KÖDÖBÖCZ LÁSZLÓ, HALBRITTER ANDRÁS, BÍRÓ BORBÁLA

Különböző művelésű talajokból származó *Rhizobium* törzsek tipizálása BOX PCR módszerrel

MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézet, Budapest

A fenntartható mezőgazdasági rendszerekben a talajok hasznos mikroorganizmusainak a tevékenysége különösen felértékelődik (BÍRÓ, 2002). Az egyik legfontosabb szerepe azoknak a szimbióta mikroorganizmusoknak van, amelyek a gazdanövényüket műtrágyapótló nitrogén és/vagy foszfor tápelemekkel képesek ellátni. A csillagfürtnél, nem mikotrof jellege folytán azonban csak a nitrogénkötő rhizobium baktériumokra számíthatunk, azok jelenléte és működőképessége ezért a mezőgazdasági talajokban kulcsfontosságú.

A fenti gondolatok jegyében *Rhizobium* baktériumokat izoláltunk különböző, nagyüzemi és organikus talajművelési rendszerekben termesztett csillagfürt növények gyökérgümöiből. A hagyományos nagyüzemi mintáknál műtrágya és peszticid felhasználás is történt, míg a bioművelésű mintavételi hátteret a nyíregyházi Westsik Vilmosról elnevezett vetésforgó tartamhatás kísérlet szolgáltatta. Az izolált baktériumokat szelektív, kongóvörös YEM táplemezen történő azonosítás és tisztítás után csoportosítottuk, majd az egy-egy területről származó *Rhizobium* populáció törzs-reprezentánsaiból fagyasztásos eljárással DNS-t preparáltunk. Ezt követően a DNS mintákon a MARTIN és mktsai (1992) által közölt BOX-PCR gél-elektroforézises módszert adaptáltuk a munkacsoportunk által optimalizált recept szerint (MOGGYORÓSSY és HALBRITTER, 2004) boxA primer (LOUWS, 1994) felhasználásával. A módszer segítségével összefüggéseket kerestünk a különböző talajművelési eljárásoknak a nitrogénkötő baktérium populációkra kifejtett hatásairól, illetve az egy adott talajból származó törzsek genetikai sokféleségének az alakulásáról is. A PCR eljárás során kapott géleket „Quantity one” szoftver segítségével értékeltük ki.

Megállapítottuk, hogy a hasznos *Rhizobium* populáció egyedi sokféleségének alakulására a különböző

talajművelési eljárások jelentősen befolyást gyakorolnak. Ennek megfelelően a PCR módszeres tipizálás a kétféle talajból származó *Rhizobium* törzsek közötti szignifikáns különbségeket jelzett. A nagyüzemi, kemikáliákkal és műtrágyákkal megvalósított művelési mód hatására a törzsek sokfélesége csökkent, szegényesebb, egyöntetűbb mintázat alakult ki. Ugyancsak kimutatható volt az egyazon növény fő- és oldalgyökeréből származó törzsek közötti különbség is, ami az elsődleges és a másodlagos infekcióban közreműködő baktériumok eltérő szimbiotikus képességére utal. Az összetett gyökérgümőkől származó izolátumok gél-elektroforézises mintázata alapján kimutatást nyert az is, hogy az infekció kialakítását a talajokban különböző ökofiziológiai tulajdonságú egyedek is kezdeményezhetik.

A kutatások tematikus és műszeres háttere az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA) támogatásával jött létre (T0 46610, M 036959)

BIRÓ B (2002): Acta Agronom. Hung 50: 77-85, LOUWS FJ et al. (1994): Appl. Environ. Microbiol. 60:2286-2295. MARTIN B et al. (1992): Nucl. Acids Res. 20:3479-3483. MOGGYORÓSSY T., HALBRITTER A. (2004): Proc. 9th Methodological Workshop (CHRONÁKOVÁ, A. et al. (eds). Institute Soil Biol. AS CR, Ceské Budejovice.

KÖNCZÖL KÁLMÁN, DOMONKOS DÁVID

A biogenerikus üzlet

Richter Gedeon Rt., Budapest

A modern rekombináns fehérje technológia az 1980-as évek elején kezdődött, midőn elsőként a rekombináns inzulin és a humán növekedési hormon gyógyászati alkalmazását engedélyezték. Napjainkban, több, mint húsz évvel később, 80 feletti a gyógyászatban alkalmazott rekombináns fehérjék száma, és úgy vélik, hogy a követő termékek fejlesztése jelentős üzleti haszonnal kecsegtet. De valóban így van ez?

A leküzdendő akadályok és kockázatok forgalomba hozatal előtti és forgalomba hozatal utáni kategóriákra oszthatók. A sejtbiológiát is magában foglaló gyártó eljárás egyike a biogenerikus cégek előtt felmerülő forgalomba hozatal előtti nehézségeknek. A hagyományos generikus gyártáshoz képest bonyolult folyamat szabadalmilag független sejtvonaltól indul, majd kiterjed a megfelelő gyártóhely kialakítására, a gyártó eljárás GMP szerinti validálására, és a termék analitikájára is. A következő jelentős akadály az engedélyezésre jogosult hatóságok ellentmondásos álláspontja a követő termékek összehasonlíthatóságát, minőségi követelményeit, hataásosságát és biztonságossági előírásait illetően. A forgalomba hozatal utáni akadályok közé tartozik egyebek között a beszállítói rendszer kialakítása, és a marketing.

Az előadás célja a biogenerikus fejlesztés fentiekben vázolt szempontjainak tisztázása, és esettanulmányokon keresztül annak vizsgálata, hogy vajon a biotechnológiai eredetű követő termékek valóban jó és tartós üzleti lehetőséget jelentenek-e.

KRAUSZ ERZSÉBET, SZABÓ MARIANNE, LAKATOS GYULA

Az epipelon mikrobiális aktivitása hazai vízi és vizes élőhelyeken

DE TTK Alkalmazott Ökológiai Tanszék, Debrecen

A vízi és vizes élőhelyek életében az üledék és az élőbevonat szerepe rendkívül fontos. Az élőbevonat és az üledék élőlényeknek tevékenysége eredményeképpen a vízi ökológiai rendszerekben eltérő anyagforgalmi utak jönnek létre, amelyek képesek meghatározni vagy befolyásolni az élőhelyek jellemzőit.

A laza, finom szemcséjű iszapon vagy iszapban megtalálható élőlénytársulás, az epipelon vizsgálata nemzetközi megítélésben is újabb feladatunk, hiszen az ezt alkotó élőlények és az üledék fizikai ill. kémiai folyamataival közvetlen kölcsönhatásban állnak.

A Debreceni Egyetem Alkalmazott Ökológiai Tanszék egyik kutatási feladata az élőbevonat és az üledék, illetve az arról gyűjtött epipelon minták ETS (Elektron Transzport Rendszer) - aktivitás, légzési anyagcsere maximális intenzitását adják meg. Négy éve a Szamoson és a Tiszán súlyos cianid-nehézfém szennyezés következett be és mérgezések akut hatásként a sejt-légzés gátlását okozták. Az üledékbe jutó (és az üledék felszínéhez adszorbeálódott) fémek krónikus hatásának vizsgálata fontos feladatunk az ökológiai állapot megismeréséhez, a toxikus hatások felméréséhez és a bekövetkezett környezeti katasztrófa lehetséges eliminációjához. A poszter az üledék - epipelon ETS vizsgálatok fontosabb

eredményeiről számol be.

KREDICS LÁSZLÓ¹, JAAKKO PAKARINEN², ANTAL ZSUZSANNA¹, MARIA ANDERSSON², MANCZINGER LÁSZLÓ³, MIRJA SALKINOJA-SALONEN², NAGY ERZSÉBET¹

Klinikai mintákból izolált *Trichoderma* törzsek enzimológiai és toxikológiai vizsgálata

¹MTA-SZTE Mikrobiológiai Kutatócsoport, Szeged; ²University of Helsinki Department of Applied Chemistry and Microbiology, Helsinki, Finland; ³SZTE TTK Mikrobiológiai Tanszék, Szeged

A *Trichoderma* fonalgombá-nemzetségbe tartozó fajok potenciálisan felhasználhatók a növénypatogén gombák elleni biológiai növényvédelemben, biotechnológiai jelentőségüket pedig celluláztermelő képességüknek köszönhetik. Az elmúlt évtizedben számos adat látott napvilágot a nemzetség klinikai jelentőségével kapcsolatban is, egyes *Trichoderma* törzsek ugyanis legyengített immunrendszerű és dializált betegek újonnan felbukkanó opportunistá kórokozói közé tartoznak. A *Trichoderma* törzsek lehetséges virulenciafaktoraival kapcsolatban azonban nem állnak rendelkezésre adatok. A jelen tanulmány célja klinikai *Trichoderma* izolátumok extracelluláris proteázok termelésére való képességének, valamint emlőssejtekkel szembeni toxicitásának vizsgálata volt.

A klinikai törzsek indukált folyadéktenyészetek felülúszójában a fehérjebontó enzimaktivitásokat 11 különböző kromogén *p*-nitroanilin szubsztráttal vizsgáltuk. Az *N*-benzoiil-L-Phe-L-Val-L-Arg-*p*-nitroanilid szubsztrátot hasító tripszin-típusú, az *N*-szukcinil-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-*p*-nitroanilid szubsztrátot hasító kimotripszin-típusú, valamint az *N*-szukcinil-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Leu-*p*-nitroanilid szubsztrátot hasító kimoelasztáz-típusú aktivitások valamennyi vizsgált törzs esetében kimutathatóak voltak. A tripszin- és kimotripszin-típusú aktivitások oszlopkromatográfiás szétválasztása mindkét aktivitás esetében összetett, számos izoenzimből álló enzimrendszer jelenlétére utalt. E két proteáz rendszer pH-függésének vizsgálatából nyert eredmények arra engednek következtetni, hogy a különböző izoenзимek eltérő pH-optimummal rendelkeznek.

A törzseken egy gyors, szemikvantitatív spermatoxicitási tesztet is elvégeztünk, melynek során 200 ml vaddisznósperma-szuszpenziót 1, 2 illetve 5 µl metanolos *Trichoderma*-kivonattal kezeltünk. A spermaszuszpenziót 15 percig szobahőmérsékleten, majd 5 percig 37 fokon inkubáltuk, ezt követően fáziskontraszt-mikroszkóppal vizsgáltuk a spermatozoák mozgási képességét. A spermatozoák több, mint 90%-a mozgóképes volt a kezeletlen kontroll mintákban és az 5 µl metanollal kezelt mintákban egyaránt. A *T. longibrachiatum* UAMH 9515, ATCC 201044, CM382 és a *T. harzianum* CBS 102174 törzsek 5 µl, 1,25 mg biomassa/ml⁻¹-es koncentrációjú metanolos kivonataival történt kezelés hatására a spermatozoák több, mint 90%-a elvesztette mozgási képességét, ami arra utal, hogy ezek a törzsek a spermasejtekre toxikus, hőstabil metabolitokat termelnek. A fenti négy törzset további toxicitási vizsgálatoknak vetettük alá. A többi vizsgált törzs nem bizonyult toxikusnak a spermatozoák 5 µl metanolos kivonattal történő kezelése során.

Az extracelluláris fehérjebontó enzimek, valamint a toxikus metabolitok termelésére való képesség egyaránt a *Trichoderma* törzsek, mint újonnan felbukkanó opportunistá kórokozók lehetséges virulenciafaktorai közé tartozik.

A munka az F037663-as számú OTKA-pályázat támogatásával készült.

KRISTÓF KATALIN, CSER VIKTÓRIA, KARDOS SZILVIA, GHIDÁN ÁGOSTON, ROZGONYI FERENC

Perinatális intenzív centrumokban ápolt újszülöttek hemokultúráiból izolált multirezisztens koaguláz-negatív staphylococcusok glikopeptid érzékenysége

Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Budapest

A koaguláz-negatív staphylococcusok fertőzéses folyamatokban betöltött szerepének klinikai megítélése az elmúlt évtizedben sokat változott. Bizonyos betegek körében (pl. immunkárosodottak), ill. betegcsoportokban (pl. protézis beültetettek) egyértelműen bizonyítható infekciót okozó szerepük. 2001-2004 során a Semmelweis Egyetem perinatális intenzív centrumaiban ápolt, klinikailag igazoltan szepszis állapotú koraszülöttek hemokultúráiból mikrobiológiai laboratóriumunkban izolált *S. epidermidis* és *S. haemolyticus* törzsek glikopeptid érzékenységét vizsgáltuk. A vizsgálati periódus alatt 7762 hemokultúrából 910 esetben (12%) kaptunk pozitív tenyésztési eredményt. Ezen pozitív mikrobiológiai tenyésztési eredmények 64%-át (584 eset) koaguláz-negatív staphylococcusok adták. Az

izolátumok identifikálása API ill. ATB (bioMérieux) módszerrel történt. A törzsek antibiotikum érzékenységének meghatározását korongdiffúziós és mikrodilúciós eljárással végeztük az NCCLS ajánlása szerint. A két leggyakrabban izolált species - *S. epidermidis* és *S. haemolyticus* – nagy százalékban rezisztensnek bizonyult a perinatális intenzív centrumokban hagyományosan alkalmazott profilaktikus szerekkel (ampicillin, gentamicin) szemben. Korongdiffúziós módszerrel vizsgálva mindkét speciesbe tartozó izolátumaink vancomycinre érzékenyek voltak. Teicoplaninra a *S. epidermidis* törzsek (n=412) 80,5%-a volt érzékeny, 19 %-a mérsékelten érzékeny ill. 0,5%-a rezisztens. A *S. haemolyticus* törzseknél (n=90) ue. értékek 81%, 17%, 2%. Mikrodilúciós módszert alkalmazva a *S. epidermidis* törzsek vancomycinnel szembeni MIC90 és MIC50 értéke is 4µg/mL, míg teicoplaninnal szembeni MIC90 értéke 8µg/mL, MIC50 értéke 4µg/mL. Ugyanezen vizsgálati módszerrel a *S. haemolyticus* törzsek vancomycinnel szembeni MIC90 és MIC50 értéke is 4µg/mL, míg teicoplaninnal szembeni MIC90 értéke 16µg/mL, MIC50 értéke 8µg/mL. A két különböző glikopeptiddel szembeni MIC értékek emelkedettsége nem minden esetben volt párhuzamos. A MIC vizsgálat korrektebb eredményt adott, különösen a teicoplanin vizsgálatánál. Emelkedett MIC értékű izolátumainknál végeztünk *vanA*, *vanB* gén kimutatást is, de pozitív eredményt nem kaptunk. Összefoglalásként megállapítható, hogy a széptikus állapotú perinatális intenzív centrumokban ápolt újszülöttek hemokultúráiból izolált koaguláz-negatív staphylococcusok okozta fertőzések terápiajában gyakran csak a glikopeptidek a választható szerek, amelyek iránti érzékenység meghatározása korrekt mikrobiológiai vizsgálatokon kell, hogy alapuljon.

KRUCSÓ BARBARA¹, CSISZÁR KÁROLY², GACS MÁRIA³, PÁSZTI JUDIT¹

Magyarországi *Streptococcus pyogenes* izolátumok molekuláris tipizálása

¹Johan Béla OEK Fágtypizálási és Molekuláris Epidemiológiai Osztály, Budapest; ²Nógrád Megyei ÁNTSZ, Salgótarján; ³Johan Béla OEK Bakteriológia I, Budapest

A *Streptococcus pyogenes* (A csoportú *Streptococcus*) által okozott, régóta jól ismert kórfórmák mellett az 1980-as évek végén egyre gyakrabban kerültek világszerte leírásra e kórokozó által kiváltott súlyos invazív infekciók, melynek kialakulásában virulencia faktorai (toxinok, szuperantigének, M és M-like proteinek stb.) játszanak szerepet. Az egyik legfontosabb virulencia markert, az M proteint korábban szerológiai alapú módszerekkel vizsgálták és sorolták be típusokba. Ma már nemzetközileg a legelterjedtebb módszer az M protein termeléséért felelős gén (emm) PCR-el történő detektálása. Az emm gén kimutatása, a keletkezett amplicon méretének, szekvenciájának és RFLP (Restriction Fragment Length polymorphisms) mintázatának meghatározásával diagnosztikus és epidemiológiai értékkel rendelkező adatok nyerhetők a vizsgált izolátumokról. Súlyos kórképekkel járó esetekben leggyakrabban az M1 és M3 típusokat mutattak ki. Gyakori M típusok továbbá az M11, M12, M28, melyek előfordulásában földrajzi eltéréseket is tapasztaltak. A szerzők célja a magyarországi klinikai izolátumok genetikai rokonságának vizsgálata, különböző infekciókból származó törzsek emm ampliconjának jellemzésével, és a leggyakoribb emm típusok meghatározásával. Az emm gén kimutatását specifikus PCR-rel, az amplicon jellemzését szekvencia meghatározással és RFLP vizsgálattal, a törzsek makrorestrikciós kromoszóma analízisét PFGE (pulsed field gel electrophoresis) módszerrel végezték. 46 izolátum közül 18 légúti, 20 felszíni pyogen fertőzésekből, 8 invazív infekcióból, mint *Streptococcus* toxikus shock syndroma (STSS), meningitis, sepsis származott. Az emm PCR-rel kapott ampliconok 770 bp és 1478 bp nagyság közé estek. A különböző mintavételi helyekről származó izolátumok között az emm amplicon mérete változatos képet mutatott, csupán a torokminták között volt viszonylag gyakoribb egy kb 874 bp méretű amplicon, ez azonban annak tulajdonítható, hogy e törzsek többsége Nógrád megyéből származott. Az emm amplicon restrikciós analízisével (HincII és HaeIII; DdeI enzimekkel), több különböző restrikciós profil volt elkülöníthető. A PFGE vizsgálat a törzsek további diszkriminálását segítette. Torokváladékból, mellkaspunktátumból, és 3 hemokultúrából származó *S. pyogenes* emm ampliconjának (874, 884, 924, 1022, 1184 bp nagyságú termék) szekvenciáját határozták meg. A 95%-os szekvencia hasonlóság alapján (BLAST, CDC adatbázisok) a következő M típusokat azonosították: emm 1.0, emm 28.0, emm 80.0, emm 81.0 (típus, altípus), és stns544 (nemzetközileg még nem besorolt típus). Ezek közül az emm 1.0 (M1) és emm 28.0 (M28) Európában a leggyakoribb típusok közé tartoznak. Nemzetközi adatokkal egybehangzóan a vizsgálatok azt igazolták, hogy a PFGE (makrorestrikciós analízise) valamint az emm gén szakaszon

végzett RFLP (mikrorestrikciós analízis) párhuzamos használatával a magyarországi törzsek genetikai rokonsági foka jól meghatározható, a szekvenálási reakciókkal az M típusok jól besorolhatóak nemzetközi gyakorlat szerint, így összehasonlíthatóvá válnak más országok törzseivel.

KUCSERA JUDIT, PFEIFFER ILONA, GÁCSER ATTILA, KEVEI FERENC

Strukturális diverzitás a Bazidiomycota élesztőgombák mitokondriális genomjában

SZTE TTK Mikrobiológiai Tanszék, Szeged

A mitokondriumoknak saját genetikai rendszerük van; funkciójuk az összes eukariótában szigorúan meghatározott és állandó. A mitokondriális DNS (mtDNS) a légzési lánc és/vagy az oxidatív foszforilációban szerepet játszó proteinek és a mitokondriumban lejátszódó proteinszintézis egyes strukturális elemeit kódolja (riboszómális proteinek, tRNS-eket, rRNS-t, RNS érés). E funkcionális konzervatívizmussal szemben a mtDNS struktúrája és géneexpressziós mechanizmusa igen változatos. A mai napig meglehetősen kevés bazidiomycota élesztőgomba mitokondriális genomanalízisét végezték el, de a diverzitás már így is jól nyomon követhető.

A mtDNS-eket általában térben többszörösen feltekeredett, kör alakú molekuláknak tartották, melyet mind az elektronmikroszkópos (ELMI) vizsgálatok, mind a restrikciós enzimes emésztések bizonyítanak. Ilyen formát találtunk a bazidiomycota *Trichosporon pullulans* VKM Y-273 és 2303 törzsek esetében elektronmikroszkópos kontúrjuk alapján. MtDNS-ük gélelektroforézis során egy meghatározott éles sávba futott, RFLP képük – nyolc különböző restrikciós enzimmel végzett emésztéssel – teljesen egyforma mintázatot mutatott annak ellenére, hogy eltérő földrajzi helyről és forrásból lettek izolálva. Mindkét izolátum mérete 27,3 kb volt.

Újabb kutatások szerint a mtDNS-ek gyakran fordulnak elő lineáris formában is. Ezt a struktúrát mutatta a *Dioszegia hungarica* (*Cryptococcus hungaricus*) CBS 4214 törzse. Az ELMI vizsgálatokkal elsősorban heterogén méretű lineáris formákat figyeltünk meg. A mtDNS gélelektroforézis során egy elmosódott sávba futott, méretét fizikai térképezéssel 27,1 kb-ban határoztuk meg.

Ezen formákkal ellentétben a *Cystofilobasidium* sp. (előzőleg *Cryptococcus hungaricus*) CBS 6569 törzse egyedi mitokondriális DNS szerveződést mutatott: az izolált natív mtDNS nyolc sávban vált szét agaróz gélen. Ezek a molekulák mitokondriális géneket tartalmaztak a hibridizációs kísérletek alapján, méretük 21-2,1 kb között volt. Ehhez hasonló struktúrát figyeltünk meg a *Cystofilobasidium capitatum* IFM 48185 törzs esetében is, ahol a mtDNS legalább 11 sávba vált szét enzimátikus hasítás nélkül.

Öt *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) törzsnél a durva mitokondriális frakcióban kizárólag plazmidszerű struktúrákat láttunk DNS hibridizációval. Ugyanazon törzs és az egyes törzsek plazmidjai között is találtunk szekvencia homológiát. Viszont nem volt homológia a *P. rhodozyma* plazmidjai és más gomba plazmidok között. Mivel nem találtunk egyéb DNS-t a mitokondriális frakcióban (szemben a *P. rhodozyma* CBS 5905 törzsével), ésszerű azt feltételezni, hogy ez a plazmidszerű DNS képviseli a mtDNS-t ezen törzsekben. További kísérletek folynak a feltételezés bizonyítására.

A fentebb felsorolt eredményekből nehéz általánosítani a bazidiomycota élesztőgombák mitokondriumának, ill. genomjának strukturális szerveződésére vagy evolúciójára vonatkozóan. Kevés fajt vizsgáltak meg eddig, de ennek ellenére nagyfokú strukturális diverzitás tapasztalható, ami heterogén eredetüket tükrözi.

KUN SZILÁRD, REZESSYNÉ SZABÓ JUDIT M., MAYER ÁGNES, HOSCHKE ÁGOSTON

Probiotikus starterkultúrák alkalmazása szójaalapú termékek előállítására

BCE Sör- és Szeszipari Tanszék, Budapest

Az elmúlt évtizedek társadalmi, gazdasági változásai révén megváltoztak a fogyasztói igények. A fogyasztók tudatosan vásárolnak olyan jellegű élelmiszereket, amelyek kedvező hatást fejtenek ki az egészségükre, segítenek a betegségek megelőzésében, és jó közérzetet biztosítanak. Alapvető elvárás lett az élelmiszerekkel szemben, hogy magas tápértékűek (vitaminokban, esszenciális zsírsavakban, makroelemekben gazdagok), toxikus anyagoktól mentesek, íz, illat, szín, állag szempontjából is megfelelőek legyenek. A szója összetett növényi fehérjeforrás, és emellett megfelelő mennyiségben

tartalmaz ásványi anyagokat, vitaminokat és rostokat. Klinikai tesztekkel bizonyították, hogy a szója fogyasztása kedvezően befolyásolja a zsír és cukor anyagcsere folyamatokat, a bélműködést és gátolja a szív és érrendszeri betegségek kialakulását. A nyers-babos íz és az antinutritív oligoszacharidok (raffinóz, sztachióz, melyek flatulencia faktorok) miatt azonban sokan nem kedvelik. Ha viszont a szójatejet olyan mikroorganizmusokkal fermentáljuk, melyek lebontják a nemkívánatos oligoszacharidokat, valamint elveszik a szója babos ízét, növelhetjük a szójafogyasztást.

Ezen elvek figyelembevételével kísérleteink során erjesztett szójatej előállítására probiotikus starterkultúrákat használtunk, amelyek a kellemes savanykás íz mellett más kedvező élettani hatást (immunrendszer stimulálása, antimutagén hatás, koleszterinszint csökkentése stb.) is kifejtenek a fogyasztóra. A szójatej erjesztéseket a *Bifidobacterium lactis* (Bb-12), *Lactobacillus acidophilus* (La-5), *Streptococcus thermophilus* (St-20) törzsekkel és ezek keverékeivel végeztük, amelyeknek pozitív élettani hatása klinikailag bizonyított és kedvelt ipari starterkultúrák.

Az erjesztések során meghatároztuk a szójatejen egymás mellett tenyésztett probiotikus baktériumok élősejt koncentrációját és jellemeztük a szójatej mintákat a kialakult állomány és a pH érték alapján is. Módszertani vizsgálatokat végeztünk a probiotikus baktériumok egymás melletti mennyiségi kimutatására. A módszer kifejlesztése során olyan szelektív tápközegeket kerestünk, amelyen csak meghatározott probiotikumok szaporodnak. A kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy a legideálisabb probiotikus baktériumkeverék a *B. lactis* (Bb-12) és a *S. thermophilus* (St-20) fajok keveréke. Ezt igazolja mind a baktérium koncentráció alakulása, mind az előállított szójajoghurt pH-ja és állaga is.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a probiotikus starterkultúrák alkalmasak szójaalapú termékek előállítására és olyan élelmiszer készíthető segítségükkel, amit súlyos laktóz-intoleranciában, tejfehérje-allergiában szenvedők is fogyaszthatnak.

A kutatási eredményeink az Oktatási Minisztérium által támogatott NKFP-0028/2002 program keretében születtek.

KUPCSULIK BÁLINT, HARMATI ERZSÉBET, SEVELLA BÉLA

A rekombináns *Pichia pastoris* fermentáció szabályzása

BME VMK Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék, Budapest

Annak ellenére hogy a *Pichia pastoris* alkohol-oxidázán alapuló expressziós rendszer az ipari alkalmazás szintjére jutott (Laboratorios Beta, Novartis), a kinetikai elemzések és az ezeken alapuló fermentációs szabályozási módszerek ellentmondásokat mutatnak. Célunk ezen problémák vizsgálata volt a termékre vetített produktivitás javítása érdekében.

A *P. pastoris* a rekombináns termék képzése során a metanolt használja mint inducort, szén és energiaforrást. A heterológ termék képződését a metanol indukált alkohol-oxidáz 1 (AOX1) promotor szabályozza. A szubsztrát hasznosulásért felelős alkohol-oxidázt *P. pastoris* Mut⁺ (Methanol utilization type +) változat estén az AOX1 és AOX2 gén, Mut^S (Methanol utilization type Slow) változatnál pedig csak az AOX2 gén képezi. A Mut^S változatban csak mintegy 10%-nyi alkohol-oxidáz aktivitás mérhető a Mut⁺-hoz képest. A metanol kiemelt szerepét fokozza, hogy az oxidációja során képződő formaldehid és hidrogén-peroxid toxikus a sejtekre. Mivel a szubsztrát-koncentráció megfelelő szintjének meghatározása és tartása elsődlegesen determinálja a termékhozamot, többféle módszert dolgoztak ki a metanol-koncentráció tartására:

1. A metanol fermentléből történő direkt mérésén alapuló módszerek közül az illékony szerves anyagot mérő szenzorok használata terjedt el. Méréseink szerint ezek karakterisztikája nem változik jelentősen a sejtkoncentrációval, viszont a mérő rendszer alapjele mind a fermentor kialakítástól, mind a sejtkoncentrációtól függ, így a fermentáció során változik. További problémát jelent nagyméretű reaktorok esetén a mérőelektrod és a szubsztrát beadagolási pontok szabályozás szempontjából megfelelő elhelyezése.

2. A szubsztrát előre tervezett módon történő adagolása kinetikai modelleken alapul. Ezen modellek jelentős része unkompetitív inhibícióval írja le a fajlagos termékképzési sebességet a szubsztrát-koncentráció függvényében, és ehhez lineáris függvényel kapcsolja a fajlagos szubsztrát hasznosulási sebességet illetve a termékképzést¹. Bár bizonyos kinetikai paraméter értékek eltérő törzseknél jelentősen változhatnak, a leírás a Mut⁺ változatra alkalmas, míg méréseink szerint a Mut^S változat viselkedése ennél összetettebb.

3. Az oldott oxigén koncentrációval (DO) történő szubsztrát adagolás szabályzást tekintik a harmadik lehetséges megoldásnak. Ez a módszer kapcsolatot feltételez a metanol-koncentráció és a metanol adagolás hatására bekövetkező DO változás között. Kísérleti eredményeink statisztikai értékelése ezt nem igazolja, kapcsolat alapvetően a beadagolt metanol mennyiségével áll csak fenn, így ezzel a módszerrel a kívánt stabil metanol szint nem tartható. A fluktuáló metanol szint mind Mut^+ , mind modelljeink szerint Mut^S fermentáció esetén is jelentősen csökkenti a produktivitást. Modelljeinkbe beépítettük a K_L értékeknek korábban mellőzött metanol-koncentráció függését.

Összegezve a modell és kísérletes eredményeket megállapítható, hogy sikeres metanol-koncentráció szabályzás kinetikai alapú szubsztrát adagolás alkalmazásával történhet, on-line módon végzett kontroll mellett.

1. Pais *et al.* Biotechnol Lett **25** (2003) 251.

2. Minning *et al.* Biotechnol. **86** (2001) 59.

KUSTOS ILDIKÓ¹, ANDRÁSFALVY MÁRTON², KILÁR FERENC³, KOCSIS BÉLA¹

Vashiányos környezet külső membrán fehérje összetételre gyakorolt hatásának elemzése kapilláris elektroforézissel és chip technológiával

¹PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet, Pécs; ²Kromat Kft. Molekuláris Biológia Ágazat, Budapest; ³PTE ÁOK Bioanalitikai Intézet, Pécs

Az élő szervezetbe behatoló baktériumok vashiányos környezetben kénytelenek szaporodni. Az emberi szervezet vas ionjai vaskötő glikoproteinekkal (traszferrin, laktoferrin) képeznek komplexet, így az élő szövetekben rendelkezésre álló szabad vas szintje jóval alacsonyabb a táptalajokban található mennyiségnél. Ezen állapot leküzdésére a baktériumok nagy affinitású, vasfelvételre képes sziderofórokot termelnek. Ezenkívül nagy molekulatömegű külső membrán fehérjék (OMP) expressziója is indukálódik, amelyek receptorként szolgálnak a vas-sziderofór komplexek számára.

Munkánk célja az *in vitro* előidézett vashiány hatásának vizsgálata volt az OMP összetételre. Erre a célra egy új módszert, a chip technológiát alkalmaztuk, és eredményeinket összehasonlítottuk a korábban kidolgozott kapilláris elektroforetikus metodikával.

Vizsgálataink során egy standard és 5 klinikai mintából izolált *Pseudomonas* törzs OMP profilját határoztuk meg kontrol körülmények között és vashiányos állapotban. A kapilláris elektroforetikus (CE) méréseket 50 μ m belső átmérőjű szilika kapillárisban végeztük, mely az alkalmazott nagy feszültség következtében 20 perc alatt biztosította a fehérjék molekulatömeg alapján történő elválasztását.

Forradalmian új megoldást jelenthet a chip technológia alkalmazása a fehérjék elválasztására, detektálására, amely segítségével 45 secundum alatt lehetséges a bakteriális proteinek szeparálása. A chip mikrokapilláris rendszerében elektrokinetikai erő vezérli a folyadék áramot, és e folyadék áramlás során játszódik le a keverés, inkubálás, jelölés, szeparálás és detektálás folyamata. A mikrokapilláris rendszerbe töltött lineáris polimert tartalmazó gél mátrixban történik az elektroforetikus elválasztás, a detektálás laser-indukált fluoreszcencián alapszik.

A vashiány hatására mind a standard, mind a klinikai izolátumok mintázatában nagy molekulatömegű OMP expressziója volt kimutatható. A chipen kapott elektroferogramokon a törzsekben 1-3 nagy molekulatömegű (70-100 kDa) fehérje csúcs megjelenését észleltük.

A chip és CE fehérje profilok, illetve a vashiány hatására kifejeződő OMP-k molekulatömegei jó korrelációt mutattak a két módszerrel. Ugyanakkor a chipek segítségével néhány secundum alatt nyertük a számítógépben tárolható elektroferogramokat, és a két belső standard alkalmazásával azonnal megjeleníthetőek voltak a vizsgált fehérjék molekulatömegei és koncentrációjuk. A nagy molekulatömegű tartományban (\approx 100 kDa) a chip technológia felbontó képessége és jel-zaj viszonya jelentősen meghaladta a kapilláris elektroforézisét.

LEITER ÉVA¹, EMRI TAMÁS¹, PUSZTAHELYI TÜNDE¹, SZAPPANOS HENRIETTA², CSERNOCH LÁSZLÓ², FLORENTINE MARX³, HUBERTUS HAAS³, PÓCSI ISTVÁN¹

A *Penicillium chrysogenum* kis molekulatömegű antifungális fehérjéjének (PAF) hatásmechanizmusa

¹DE TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék; ²DE OEC Élettani Intézet, Debrecen; ³Medical University of Innsbruck Department of Molecular Biology, Innsbruck Austria

A *Penicillium chrysogenum* fonalas gomba nagy mennyiségben termel kis molekula tömegű ($M_r=6500$), bázikus antifungális hatású fehérjét (PAF) szacharóz és nitrát tartalmú táptalajon.

A PAF 42.6 %-ban homológ az *Aspergillus giganteus* által termelt antifungális fehérjével és 37 %-os homológiát mutat az *Aspergillus niger* hasonló tulajdonságokkal rendelkező proteinjével (1).

A PAF gátolja számos humán oportunistá patogén és fitopatogén fonalas gomba, például *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *Botrytis cinerea*, *Trichoderma koningii*, *Neurospora crassa* növekedését, azonban nem mutat semmilyen hatást élesztőkön és baktériumokon.

A PAF hatása többek között megváltozott morfológiai formákban jelentkezik, a hifavégek megduzzadnak, rövid elágazások képződnek. Ezen kívül PAF a szenzitív fajokban oxidatív stresszt és K^+ -effluxot (10 $\mu\text{g/ml}$ PAF esetén) vált ki, valamint a hifák csökkent metabolikus aktivitása is kimutatható (FUN-1 fluoreszcens festéket használva) (2).

A PAF főleg a citoplazmában lokalizálódva fejti ki hatását az érzékeny fajokban. A PAF bejutása aktív transzporttal történik, mivel a légzési lánc gátlása KCN-dal és NaN_3 -dal megakadályozza a PAF intracelluláris akkumulálódását (3).

A PAF K^+ -effluxot okozó hatása befolyásolja a membrán polarizáltságát, ezért az *Aspergillus nidulans* di-8-ANNEPS feszültség-érzékeny festékkel kezeltük és konfokális mikroszkópiával kimutattuk, hogy a hifavégek PAF kezelés hatására hiperpolarizálódnak.

Mivel a PAF aktív transzporttal jut be a sejtekbe és szelektíven hat (csak fonalas gombákon), a PAF belépése nagy valószínűséggel receptormediált, G-proteinnel kapcsolt folyamat. Ennek igazolására a PAF hatását guanidin nukleotid analógok jelenlétében, valamint G-protein-működésben sérült *A. nidulans* mutánsokon tanulmányoztuk. Hipotézisünkkel összhangban a $\text{GTP}\square\text{S}$ (a G-proteint állandóan aktív állapotban tartó effektor) gátolta a PAF hatását szenzitív *A. nidulans* FGSC26 törzsön, illetve az *A. nidulans fadA^{G203R}* ($\text{G}\square$ alegység domináns interferáló mutánsa) törzs is rezisztens volt a PAF-vel szemben.

Régóta ismert, hogy az oxidatív stressz apoptózist válthat ki eukariótákban, ezért a szenzitív *A. nidulans* FGSC26 törzs protoplasztjait PAF-vel kezeltük és a megjelenő apoptózis markereket AnnexinV (sejtmembrán károsodás és inverzió), illetve TUNEL (DNS-fragmentálódás) eljárásokkal detektáltuk. A PAF kezelés hatására az apoptózist mutató protoplasztok aránya a 4-szeresére emelkedett a kontroll tenyészetekhez képest.

Hivatkozások:

1. Marx F, Haas H, Reindl M, Stoffler G, Lottspeich F, Redl B. (1995) *Gene* 167:167-171.
2. Kaiserer L, Oberparleiter C, Weiler-Görz R, Burgstaller W, Leiter É, Marx F. (2003) *Arch. Microbiol.* 180:204-210.
3. Oberparleiter C, Kaiserer L, Haas H, Ladurner P, Andratsch M, Marx F. (2003) *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3598-3601.

LEITER ÉVA¹, PUSZTAHELYI TÜNDE¹, FLORENTINE MARX², HUBERTUS HAAS², PÓCSI ISTVÁN¹

A *Penicillium chrysogenum* glükóz oxidáza egy potens antifungális enzim

¹DE TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék, Debrecen; ²Department of Molecular Biology, Medical University of Innsbruck, Austria

Számos mikrobiális enzim képes a glükóz oxidálására. Ezek közül a legfontosabb a glükóz oxidáz (GOX), amely D-glükonsav és hidrogén-peroxid képződését katalizálja glükózból oxigén jelenlétében.

Az általunk vizsgált glükóz oxidázt *Penicillium chrysogenum*ból tisztítottuk és jellemeztük. Az enzim N-terminális szekvenciája homológnak bizonyult az *Aspergillus niger* és a *Penicillium amagasakiense* által termelt GOX-éval. Más gombák által termelt GOX-okhoz hasonlóan a *P. chrysogenum*ból

származó enzim egy $M_r=155000$ relatív molekula tömegű homodimer (α_2 ; $M_{r,\square}=76000$), amelynek izoelektromos pontja 5.4.

Régóta ismert, hogy a glükóz oxidáz a hidrogén-peroxid termelése miatt antimikrobiális hatású. Érdekes módon a GOX-ok antifungális hatását még nem tanulmányozták részletesen, ezért célul tűztük ki a *P. chrysogenum* GOX antifungális hatásspektrumának a vizsgálatát számos teszt-mikroorganizmus bevonásával. A várakozásnak megfelelően az általunk izolált enzim már 50 μ g/ml-es koncentrációban alkalmazva is hatékonyan bizonyult az élesztők és fonalas gombák széles spektrumával szemben, de a tesztelt gombák GOX érzékenysége eltérő mértékű volt. A humán patogén *Candida* fajok növekvő szenzitivitást mutattak a következő sorrendben: *C. albicans* \approx *C. dubliniensis* < *C. parapsilosis* < *C. glabrata* \approx *C. krusei*. Az *Aspergillus* fajok is eltérő mértékben voltak GOX-érzékenyek a következő sorrendnek megfelelően: *A. giganteus* < *A. niger* \approx *A. terreus* < *A. nidulans*. Ezen túlmenően az exponenciális fázisban levő *P. chrysogenum* is szenzitív volt a saját GOX-ára. A GOX-érzékenység egyértelműen a különböző gombák sajátos, fajspecifikus antioxidatív védekező képességének a függvénye volt.

A *P. chrysogenum* GOX citotoxicitása *A. nidulans* tenyészetekben redukálható volt C-vitamin hozzáadásával, ugyanakkor a szarvasmarha máj kataláz még nagy kataláz:GOX arány esetén sem bizonyult hatékonyan. Nagy valószínűséggel a két enzim együttes alkalmazásakor az oxigén gyorsan elhasználódott a rendszerben, és ez a másodlagos toxicitás váltotta fel a GOX elsődleges sejtkárosító hatását.

Az eddigi eredmények alapján a gombák által termelt GOX-ok, különösen a H_2O_2 -hasznosító laktoperoxidázokkal és haloperoxidázokkal kombináltnak, jól alkalmazhatóak lesznek az orvosi gyakorlatban használt eszközök felületét szennyező bakteriális és fungális biofilmek eltávolítására.

LENTI ISTVÁN, BORONKAY FERENCNÉ

A *Sepedonium chrysospermum* (Bull.: Fr.) Link mikofil gomba jelenléte a Bátorligeti Rezervációban

Nyíregyházi Tanárképző Főiskola, Növénytan Tanszék, Nyíregyháza

Bátorligetet, a természetnek ezt a gyönyörű darabját értékesebbé tesszük a benne fellelhető, gazdagon tenyésző gombák. Az ezidáig elvégzett mikológiai kutatások bizonyították, hogy a bátorligeti területek további és alapos feltárása, igen szép reményekkel, eredményekkel kecsegtet. Ugyanis a gombák kvantitatív viszonyaira it

Célkitűzésünk a rezerváció területén parazitált nagygomba fajok számbavétele, a mikoparazita gombák morfológiájának tanulmányozása, ökoló

A szakirodalmi adatok szerint a mikofil gombák lehetnek egy és több nagytestű gombafajon élősködők (Helfer 1986). Közülük a

A gombafelvételezéseket a “véletlen bejárás” módszerével végeztük. A nagytestű gombák meghatározását követően identifikáltuk a mikofileket is, Helfer (1991) módszerével, valamint Bánhegyi et al. (1985) és Hawksworth (1981) határozókulcsaival ellenőriztük eredményeinket.

Az 1999-2003-as évek felvételezései során megállapítottuk, hogy a *Sepedonium chrysospermum* (Bull.: Fr.) Link mikoparazita gomba a rezerváció nagytestű gombáit erősen fertőzi. A 20 parazitált gombafaj a *Boletus* (11), *Gyrodon* (1), *Gyroporus* (1), *Leccinum* (1), *Tylopilus* (1), *Xerocomus* (5) nemzetségekből kerültek ki.

E miofil gomba tenyészte PDA-táptalajon tömött, kezdetben fehér, majd sárga, barnássárga színűvé válik. Hét nap alatt átlagban 6 cm-es átmérőjű telepnövekedést produkált 22 ± 2 °C-on. A fialokonídium-tartója laza, egyszerű, “verticiloid”. A fialokonídiumai egysejtűek, hialinok, alakjuk cilindrikal, ellipszoid, olykor kissé deformáltak. Méretei $19,2(8,0-28,0)\times 10,9(8,0-16,0)$ μ

Egy hét elteltével a tenyészetben megjelennek az aleuriokonídiumok, melyek egysejtűek, előbb hialinok, majd besárgulnak. Felületük kissé szemölcsös. Méretei: $18,6(18,0-20,0)\times 16,8(16,0-18,0)$ μ

A parazitált nagytestű gomba eleinte foltosan kifehéredik, a foltok idővel összeolvadnak, az egész gomba felülete fehér, ill. szürkésfehér színű, mert a mikofil micéliuma és a fialokonídiumtartói gyapjasan beborítják. Később a fertőzött gomba sárga színt vesz fel, állaga megpuhul, összerohad, szétfolyik. Kellemetlen bűz kíséri a rothadási folyamatot. Végkifejl

A gomba perfekt alakját nem tudtuk izolálni.

et a bűdös lágyrothadás.m. Átlagos hosszúság/szélesség arányuk 1,1.m. Átlagos hosszúság/szélesség arányuk 1,75.

Hypomyces genust azonosították leggyakrabban, hisz' imperfekt alakjai több gombanemzetség fajait jelenítik meg, ezek: a *Sepedonium*, a *Cladobotryum*, a *Stephanoma*, a *Sibirina*, az *Arnoldiomyces*, a *Mycogone* és a *Helminthophora* fajok. A legszélesebb gazdakörrel a *Hypomyces chrysospermus* (Bull.) Tul. aszkospórás gomba rendelkezik, ugyanis Arnold (1976) szerint 26 genusból legalább 50 fajt képes parazitálni. Imperfekt alakját Howel (1939) publikálta *Sepedonium chrysospermus* néven. t. oly jellemző, a normális diszperziótól eltérő "szuperdiszperzió", a fajok szórványos megjelenése, széles diverzitásai igényeik meghatározása, valamint a keletkezett "tünetek" leírása.

LENTI ISTVÁN, BORONKAY FERENCNÉ

A *Spinellus fusiger* (Link: Fr.) van Tiegh. mikoparazita gomba a Bátorligeti Természetvédelmi Területeken

Nyíregyházi Tanárképző Főiskola, Növénytani Tanszék, Nyíregyháza

A gombák filogenezisük során különféle szubsztrátumokat hódítottak meg, s egyik táplálkozási formájuk a "mikokannibalizmus", tehát egyes gombák más gombafajokkal táplálkoznak. Az intrahimeniális fajok (pl. a *Mycogeophyta anablasta*) átszövik a nagytestű gombák termőtesteit, s azokon változatos színekkel, gazdag formában manifesztálódnak. Megfertőzhetik a biotróf parazita gombákat is – különösen a *Mycoepiphyta parasitica* -, s azok pusztulásával önmaguk is elpusztulnak. A tisztán szaprofita (*Mycoepiphyta xylosa*) fajok csak a gazdaszervezet elpusztulása után kolonizálják azokat (Ubrizsy 1943).

A mikofil gombák kutatása már a 19. sz.-ban megkezdődött, leírásuk ma is nagy elánal tart. Hawksworth (1981) szerint korának időpontjában mintegy 1100 fajt ismertek mikoparazitaként, ma már valós mennyiségük meghaladta a 2000-ret (Vajna – Jakucs 2003).

A *Spinellus fusiger* (Link : Fr.) van Tiegh. mikofil gomba főként a *Mycena* fajokat parazitálja, de jól tenyészik egyes *Collybia* és *Amanita* fajokon is (Zycha et al. 1969). Morfológiai leírását Watson (1964, 1965) munkáiból ismerjük.

Gombafelvételezéseinket a "véletlen bejárás" módszerével végeztük a bonitált területen. A makrogombák pontos meghatározását – többek között – Gerhardt (1995), Jordan (1995), Moser (1983), Phillips (1990), Rimóczi – Vetter (1990) műveinek segítségével végeztük. A mikofil fajmeghatározására Hawksworth (1981), Bánhegyi et al. (1985) és Helfer (1991) határozókulcsai szolgáltak.

Az 1999-2003-as évek felvételezése során megállapítottuk, hogy a *Spinellus fusiger* mikoparazita gomba jelen van a Bátorligeti Természetvédelmi Területeken, s parazitálta a *Collybia dryophila* (Bull.: Fr.) Kumm., a *Coprinus micaceus* (Bull.: Fr.) Fr., a *Mycena epipterygia* (Scop.: Fr.) Gray, a *M. haematopus* (Pers.: Fr.) P. Kumm., a *M. polygramma* (Bull.: Fr.) Gray, a *M. pura* (Pers.: Fr.) P. Kumm., valamint a *M. sanguinolenta* (Alb. and Schw.) Kumm. fajokat.

E mikofil gomba tenyésztete PDA-táptalajon laza, vattaszerű, dús, s szürke légmicéliumot fejleszt, amely gyors növekedésű. A sporangiumtartó elágazás nélküli, vastag, több mint 1 cm-re is megnőhet. Világosbarna, válaszfalakat alig találunk benne.

Sporangiuma gömbölyded, mérete 147,6(139,8-164,4)×356,2(334,6-371,6) µm. Lapos, széles kolumellával rendelkezik. Sporangiospórái citrom formájúak, de akadnak gömb, vagy orsó alakúak is. Színük világosbarna. Méreteik PDA-táptalajon: 37,6(26,4-55,8)×22,4(11,2-33,2) µm.

A *Spinellus fusiger* mezotermofil, hőoptimuma 28±4 °C, de 20 °C alatt a sporulációja már vontatott, s a sporangium képzése is mérsékelt.

A fertőzött gombák kalapjain szabad szemmel is látható a mikofil gomba sporangiumtartója és a fejlett sporangium. A fertőzött gazdagomba kalapszíne barnává válik, lágy állományú lesz, majd a kalap a tönkre bukik, s végül teljesen elrothad. A tönknek a kalappal érintkező része is megbarnul, elvékonyodik, elrothad. A tünetegyüttes végkifejlete lágyrothadásban nyilvánul meg.

Tudomásunk szerint a *Spinellus fusiger* mikofil gombát a szakirodalom még nem közölte a *Coprinus micaceus* gombáról, mint gazdaszervezetről!

LIBISCH BALÁZS¹, *GACS MÁRIA¹, TERNÁK GÁBOR², RÓKUSZ LÁSZLÓ³, CSISZÁR KÁROLY⁴, FÜZI MIKLÓS¹

VIM-4 metallo- β -laktamáz termelő *Pseudomonas* törzsek epidemiológiai vizsgálata

¹Johan Béla OEK Bakteriológia I., Budapest; ²Baranya Megyei Kórház, Pécs; ³Központi Honvédkórház, Budapest; ⁴Nógrád Megyei ÁNTSZ, Salgótarján

A szerzők beszámolnak a Magyarországon izolált carbapenem rezisztens metallo- β -laktamáz (MBL) termelő, a *bla*_{VIM-4}-gént integronon hordozó *Pseudomonas spp.*-k epidemiológiai vonatkozásairól.

Elsőként 2002 augusztusában izoláltak MBL-t termelő O12-es szerotípusú *Pseudomonas aeruginosa*-t, egy a fővárosban balesetet szenvedett, s intenzív osztályon ápolat görögországi turista vizeletéből. Egy hónappal később ugyanezen az intenzív osztályon, hasonló klinikai esetben, ugyancsak a beteg vizeletéből kitenyésztett carbapenem rezisztens *P. aeruginosa* azonos fenotípusú és genotípusos sajátságokat mutatott. Ebben az időben végzett környezet bakteriológiai vizsgálatok során carbapenem rezisztens törzseket nem találtak. Mindkét betegről származó törzs esetében a *bla*_{VIM-4} gént egy első osztályú integron hordozza, mely közeli rokonságot mutat a Görögországban és Lengyelországban izolált integronokkal.

Ugyanezen az intenzív osztályon 2003 októberében végzett környezet bakteriológiai szűrővizsgálatok során, egy felületi törléstől, a korábban izolált MBL termelő *P. aeruginosa* törzsekkel megegyező szerkezetű integront hordozó *Pseudomonas putida* törzset izoláltak, ami a kórházi környezetben lezajlott interspecies géntranszfer eseményre utal. MBL-t termelő *P. aeruginosa*-t izoláltak ugyanebben az időben Pécsen is, egy hosszan, ismételt intenzív osztályon ápolat beteg vizeletéből. Ez a törzs szintén O12-es szerotípusú, VIM-4 termelő, s a Budapesten izolált törzsekével közeli szerkezeti rokonságot mutató integront hordoz. A környezet bakteriológiai vizsgálatok itt negatív eredménnyel zárultak.

A multirezisztens *bla*_{VIM} gént hordozó MBL-termelő *P. aeruginosa* törzsek hazai előfordulása felveti azt a potenciális veszélyt, hogy egyrészt a gén átvitele más Gram-negatív multirezisztens nosocomialis patogénekbe bármikor megtörténhet, másrészt európai országokhoz hasonlóan (Görögország, Olaszország) a kezdetben sporadikusan megjelenő MBL termelő törzsek endémiássá válva jelentős kórházi járványok okozói lehetnek.

LITTER JUDIT, HAMARI ZSUZSANNA, PFEIFFER ILONA, KUCSERA JUDIT, KEVEI FERENC **A mitokondriális DNS jellemzése a *Cryptococcus neoformans* fajkomplex különböző molekuláris alcsoportjaiban**

SZTE TTK Mikrobiológiai Tanszék, Szeged

Katsu és munkatársai 2004-ben közölték, hogy a *Cryptococcus neoformans* fajkomplex molekuláris elemzésével (ITS szekvencia, RAPD analízis, PCR fingerprinting) nyolc alcsoportot lehet megkülönböztetni. Vizsgálatainkban ezen altípusok mitokondriális genomjának jellemzését tűztük ki célul.

Korábbi kísérleteinkben a *C. n. var. grubii* IFO 410 (CN-O) és a *C. n. var. neoformans* IFM 5844 (CN- α) törzsek mitokondriális DNS-ének fizikai és funkcionális térképét megszerkesztettük, valamint elvégeztük ezek részletes összehasonlítását.

Ennek során megállapítottuk a két mtDNS genom pontos méretét, amely CN-O esetében 24.1 kb, a CN- α esetében pedig 32.6 kb volt, valamint Southern hibridizációval és szekvenálással lokalizáltuk a mitokondriális légzésben fontos szerepet játszó gének többségét.

A mitokondriális genomok méretében mutatkozó eltérést három nagyobb régióhoz tudtuk kapcsolni. Szekvenciavizsgálatuk kimutatta, hogy a legnagyobb méretkülönbség a *cox1*, a *cob*, a *nad5*, az *rnl* génekben, valamint az *atp6-atp9* gének közti intergénikus régióban található. A különbségeket főképp intronok jelenlétével magyaráztuk.

Az eltéréseket mutató területekre írt primerek felhasználásával végzett PCR alkalmasnak bizonyult a két törzs elkülönítésére, és ezáltal alapját képezheti polimorfizmus vizsgálatainknak.

A fent említett génekhez írt primerek felhasználásával nyolc, PCR fingerprint kísérletek alapján a különböző molekuláris genotípus csoportot képviselő törzs mitokondriális DNS-ét vizsgáltuk meg. A kapott eredmények alapján a törzsek az egyes géneknél eltérő csoportokba rendezhetők. Az egyes PCR

termékek szekvencia szintű elemzése folyamatban van.

Hivatkozás:

Katsu, M., S. Kidd, A. Ando, M. L. Moretti-Branchini, Y. Mikami, K. Nishimura and W. Meyer (2004) The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. FEMS Yeast Res. 4, 377-388.

Munkánkat az OTKA (T035194) támogatásával készítettük.

LOMNICZI BÉLA

Új fertőző betegség rezervoárok kialakulása

MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet, Budapest

Az elmúlt évek sajtójában viszonylag nagy visszhangot kapott fertőző betegségek (SARS, madár és kapcsolódó emberi influenzák) ráirányították a figyelmet az evolúció és ökológia szerepére azok kialakulásának megértésében és a hatékony védekezés kialakításában. Az RNS vírusok gyors, szemünk előtt is követhető evolúciója az elmúlt egy-két évtized nagy revelációja, de hogy rezervoárok is folyamatosan keletkeznek és evolválódnak, arra az új fertőző betegségek felbukkanása a legfőbb bizonyíték. A kórokozók (a maláriától a HIV-ig) gyors evolúciójáról feltárt ismeretek is már jelentős változásokat hoztak a „steril” epidemiológiai felfogáshoz képest, azonban, az újabb fejlemények tükrében, legalábbis a vírusfertőzések tekintetében úgy tűnik, hogy az ökológiai lecke elsajátítása még hátra van. Az ökológiai megközelítés központi kérdése a rezervoár: adott faj(ok) populációinak térben és időben összefüggő együttese, ahol a fertőző ágens a végtelenségig fennmarad. E tisztán ökológiai definíciót fellazíthatjuk, amennyiben megkülönböztethetünk fenntartó és célfajt, vagy -populációt, a gyakorlati védekezés során ugyanis lehetetlen, vagy nem is szükséges a rendszer valamennyi összetevőjénél beavatkozni. Bár a házi húsevők (célfaj) vesztségének visszaszorításában a rókák (rezervoár) immunizálása döntő hatással volt. A fertőzési lánc, valamennyi 'szemének', benne a rezervoárok fontosságának felderítése természetesen nem spórolható meg. Pl. 1997-ben Hongkongban a H5N2 influenzavírus tovaterjedésének (emberre és csirkékre) veszélyét vészintézkedésként a csirkék kiirtásával oldották meg, hosszabb távra azonban a kacsák (rezervoárok) és csirkék (célpont) elkülönített tartása a megoldás, aminek gyors bevezetése ott be is vált. Az influenzavírusok esetében tanúi lehetünk annak a megállíthatatlan folyamatnak, amint az ősi rezervoár (vadonélő vízimadarak) szerepét olyan mesterségesen kialakított populációk veszik át, mint a házi vízibaromfival integrált csirketenyészetek, vagy a hatékonyságban felülmúlhatatlan élő-állat piacok. Főleg a XX. századi fejlemények tükrében ezekről a kérdésekről lesz szó az előadásban.

LUKÁCS GYÖNGYI¹, NYILASI ILDIKÓ¹, PAPP TAMÁS², SOMOGYVÁRI FERENC³, NAGY ERZSÉBET^{2,3}, VÁGVÖLGYI CSABA¹

Rhizomucor fajok gyors azonosítása lovastatin tartalmú táptalaj segítségével

¹SZTE TTK Mikrobiológiai Tanszék; ²MTA - SZTE Mikrobiológiai Kutatócsoport; ³SZTE ÁOK Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet, Szeged

Zigomikózis néven foglaljuk össze az *Entomophthorales* és *Mucorales* rend egyes tagjai (pl.: *Absidia*, *Mortierella*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*) által okozott megbetegedéseket. Az ilyen mikózisok közel 90%-át *Rhizopus* és *Rhizomucor* fajok okozzák. A *Rhizomucor* nemzetségbe két faj a *R. pusillus* és a *R. miehei* tartozik. Morfológiai jellemzőik és termofil sajátságuk alapján egyértelműen elkülöníthetők a *Mucorales* rend többi tagjától. *Rhizomucor* izolátumok azonosítására többféle módszer is létezik, de ezek használata gyakran korlátokba ütközik és a faj szintű azonosítás klinikai körülmények között sokszor nehézkes.

A lovastatin a 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) reduktáz kompetitív inhibitora, amely enzim az izoprének (szterolok és az ubiquinon) bioszintéziséhez vezető acetát-mevalonát reakciótól kulcs lépését katalizálja. A szterolok és karotenoidok bioszintézisének gátlása lovastatin koncentrációtól függően a gombasejtek ultrastruktúrájának megváltozásával, és/vagy növekedésgátlással jár. Kísérleteink során 27 klinikai és környezeti mintából származó *R. pusillus* és *R. miehei* törzs lovastatinnal szemben mutatott érzékenységét vizsgáltuk, különböző tenyésztési körülmények között. A *R. miehei* törzsek 64-128 µg/ml lovastatin koncentráció mellett is növekedtek, ezzel szemben a *R.*

pusillus törzsek növekedése már 1-2 µg/ml lovastatin jelenlétében is gátlódott. A lovastatin gátló hatása függ az inokulum nagyságától és a tápközeg pH-jától: savas pH-n erőteljesebb gátlás tapasztalható.

A kísérleti eredmények alapján kidolgoztunk egy, a *Rhizomucor* izolátumok faj szintű azonosítását biztosító, a *R. pusillus* lovastatinnal szemben mutatott érzékenységén alapuló eljárást. Ennel lényege, hogy a sporangiospórákat (10⁶ spóra/ml koncentrációjú szuszpenzióból 3 µl-es cseppben) 6 µg/ml lovastatin tartalmú MEA táptalajra (pH 4) oltva, 2 napig 37°C-on történő inkubációt követően a *R. miehei* izolátumok többé-kevésbé kompakt telepet képeznek, míg a *R. pusillus* izolátumok telepképzése teljesen gátlódik.

A két *Rhizomucor* faj lovastatin érzékenységben mutatott jelentős különbségének molekuláris háttere még feltáratlan. *Real-time* PCR kísérletek alapján mindkét faj genomja két példányban tartalmazza a HMG-CoA redukáz gént, így a feltárt különbség nem magyarázható a gént kópiaszámbeli eltéréssel.

A kutatást az OTKA (TO37471 és FO46658) támogatta.

MAG TÜNDE¹, HERPAY MÁRIA¹, D. PLÉLARD², G. MUYLDERMANS²

A Shiga toxin-termelő *Escherichia coli* (STEC) törzsek molekuláris tipizálási lehetőségei tekintettel az STX2 altípusaira

¹Johan Béla OEK Bakteriológia II., Budapest; ²Vrije Universiteit Department of Microbiology, Brussel, Belgium

Az enteropathogén *E.coli* törzsek megbetegítő képessége a genomjuk ún. pathogenitási szigetein (PAIs) elhelyezkedő virulencia gének repertoírjától függ. Az egyes virulencia gének kombinációja meghatározza az *E.coli* specifikus pathotípusait (EPEC, EHEC-STEC, ETEC, AECC, EAEC, DAEC). A virulencia faktorok átadódhatnak horizontálisan, változatos genetikai mechanizmusok révén, mozoghatnak egyes gének, vagy kapcsolt gének csoportjai ún. cluster-ei egyaránt. A humán enterális megbetegedéseket előidéző különböző *E.coli* pathotípusok közötti komplex kapcsolatrendszer jelenleg még nem teljesen tisztázott.

A Shiga toxin-termelő törzsek világszerte nagy számban okoznak hasmenést, haemorrhagiás colitist és haemolitikus urémiás szindrómát (HUS). A STEC izolátumok fontosabb virulencia faktorai: Shiga-toxin I-II (Stx1,2), intimin, enterohaemolysin, és a ~60 MDa plazmidon elhelyezkedő kataláz (*katP*), és a szekretált szerin proteáz (*espP*). Ezen specifikus gének detektálása képezi a pathotípusba sorolás egyik alapját, jelenlétük a megbetegedés jellegét, és a várható szövődmények kialakulását is alapvetően meghatározzák.

A legfontosabb virulencia faktor maga az Stx (Shiga-like toxin), amely szerkezete, és hatásmechanizmusa alapján két nagy csoportba sorolható: Stx1 és Stx2. Több megfigyelés támasztja alá, hogy az Stx2-t termelő törzsek virulensebbek, mint az Stx1-t termelők. A legsúlyosabb megbetegedésekért a Stx2 altípusai közül a Stx2c1 és a Stx2d-t termelő törzsek felelősek.

Míndez indokolta olyan molekuláris technikák bevezetését, amelyek alkalmasak a STEC virulencia faktorainak kimutatására, és a Stx toxin tipizálására. Alkalmazott módszereink: PCR, restrikciós hasítás, real-time PCR. A kísérletek eredményeként sikerült elkülönítenünk az Stx altípusait, és detektálnunk a többi patogenitási marker jelenlétét. E módszerek adaptálását követően a NERL képes a beküldött STEC törzsek pathogenetikai vizsgálatára.

MAJOROS LÁSZLÓ, KARDOS GÁBOR, MISZTI CECÍLIA, PAPPNÉ FALUSI ERZSÉBET, SZABÓ BÉLA

***Candida inconspicua* érzékenységének vizsgálata mikrodilúciós módszerrel (standard és emelt inokulum), Fungitest-tel és E-teszttel**

DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Debrecen

Negyvennyolc betegtől származó 57 *C. inconspicua* klinikai izolátum érzékenységét vizsgáltuk meg a standard (10³ sejt/ml) mikrodilúciós módszer (NCCLS M27A módszer), annak emelt (10⁴ sejt/ml), módosított változatával, E-teszt és Fungitest segítségével. A MIC értékek leolvasása 24 és 48 óra után történt. Fungitest esetén 48 óra után határoztuk meg az érzékenységi kategóriát. A kapott eredményeket a normál inokulummal végzett, 48 órás MIC értékek eredményéhez (standard metodika) hasonlítottuk.

Az NCCLS M-27A metodika alapján a törzsek 89,5 %-a a dózisfüggően érzékeny kategóriába, 10,5 %-a

a rezisztens kategóriába tartozott, érzékeny törzs nem volt.

A MIC értékek \pm egy hígítási fokban normál és emelt inokulum és E-teszt esetén 24 óra múlva 100 %-s egyezést mutattak a standard módszerrel. Emelt inokulum és E-teszt esetén 48 óra múlva az átlagos egyezés 93,7 illetve 56,3 % értékre csökkent.

Az érzékenységi kategóriákat elemezve a módosított mikrodilúciós módszerek 24 óra múlva legalább 80 %-os egyezést mutattak a standard módszerrel összehasonlítva. Az E-teszt és az emelt dózisu mikrodilúciós módszer esetén a 48 órás leolvasás a dózisfüggően érzékeny törzsek 33,3-75 %-a rezisztens volt.

A Fungitest 81,1 %-s egyezést mutatott a standard módszerrel összevetve, bár az 5 rezisztens izolátum közül négyet a dózisfüggően érzékeny kategóriába sorolt.

Eredményeink azt mutatják, hogy a *C. inconspicua* flukonazol iránti csökkent érzékenységét pontosan sem az E-teszt, sem a Fungitest, sem pedig a 24 órás mikrodilúciós módszerek nem mutatják ki pontosan. A 48 órás emelt dózisu mikrohígítós módszer és az E-teszt jelentősen megnövelte a fals rezisztens eredmények számát. Bár in vivo állatkísérleti adatok azt mutatják, hogy az emelt dózisu (10-12 mg/kg/nap) flukonazol kezelés hatásos a dózisfüggően érzékeny törzsek által kiváltott szisztémás fertőzések kezelésére, életet veszélyeztető infekciók esetén az amphotericin B az ajánlott terápia. Az életet nem veszélyeztető fertőzések kezelése illetve az empirikus flukonazol terápia folytatása csakis a standard, mikrodilúción alapuló érzékenység meghatározása után történhet.

MANCZINGER LÁSZLÓ

Komposzttűrő *Trichoderma* törzsek taxonómiája és ökofiziológiája

SZTE TTK Mikrobiológiai Tanszék, Szeged

A *Trichoderma* fajok elterjedtek a komposztban és egyéb gombatermesztési alapanyagokban. 1985-től nagymértékű termésveszteség következett be a Brit-szigetek gombafarmjain amiatt, hogy a *T. harzianum* agresszív törzseivel fertőzött komposztban nem termett gomba. Azóta a *Trichoderma* komoly termésveszteséget okozott Észak-Amerikában: Ontarióban, British Columbiában és Pennsylvániában. Ez a fertőzés zöldpenészként vált ismertté. A *T. harzianum* agresszív és nem agresszív törzsei gyakran megtalálhatók ugyanazon farm azonos mintáiban. A gombatermesztésben használt anyagokon növő *Trichoderma* fajokat nehéz egymástól megkülönböztetni. Egy gyors, pontos és érzékeny módszer az agresszív törzsek azonosítására elengedhetetlenül szükséges és előfeltétel az olyan vizsgálatokhoz melyek a környezeti faktoroknak és tenyésztési körülményeknek a betegség előfordulására gyakorolt hatásait célozzák. Újabban az agresszív *Trichoderma* törzsek azonosítására molekuláris módszereken (RAPD és RFLP) alapuló, érzékeny módszereket dolgoztak ki. E módszerek segítségével a zöldpenész izolátumokat négy csoportba osztották be: két agresszív csoportba (Th2 és Th4), egy nem agresszív *T. harzianum* csoportba (Th1) és egy *T. atroviride* csoportba (Th3). A Th4 csoport Észak-Amerika gombatermesztő területén fordul elő, a Th2 pathotípus viszont Európában dominál. A fertőzött komposztból származó izolátumok gombaparazita és szaprotróf tulajdonságait szintén tanulmányozták, hogy felderítsék az *Agaricus bisporus*-szal szemben mutatott agresszivitásuk hátterét. In vitro és in vivo antagonizmus kísérletekben mikoparazitizmust jelző hifastrukturákat csak ritkán lehetett megfigyelni. Az agresszív európai (Th2) és az észak-amerikai (Th4) izolátumok szignifikánsan több biomasszát termeltek a komposztban, mint a Th1 nem agresszív izolátumok. Mindhárom csoport tagjai biopolimerbontó enzimeket szekretáltak, melyekkel képesek voltak az *A. bisporus* sejtfalában, illetve a szalmában levő biopolimereket lebontani. Néhány ezen enzim közül valószínűleg kapcsolatban állhat az agresszivitással. Feltételezik, hogy a törzsek agresszivitásáért kompetíció, antagonizmus és parazitizmus felelős, de csak miután a törzsek a szalma bontása révén intenzíven növekedni kezdenek. Újabban egy olyan antibiotikumot izoláltak agresszív *Trichoderma* törzsekből, mely az *A. bisporus* és más fonalgombák növekedését gátolja. A vegyületet, melyet a nem agresszív törzsek nem képesek termelni, 3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metilzokumarin-ként azonosították. Ez az antibiotikum együtt más eddig azonosítatlan vegyületekkel felelős lehet az agresszív törzsek sikeres kompetíciójáért a gombakomposztban. A zöldpenész járványért felelős törzseket múlt évben elválasztották a *T. harzianum* csoporttól növekedési rátájuk, hőmérséklet optimumuk, ITS1 szekvenciájuk, valamint az EF-1alfa transzlációs elongációs faktor szekvenciájuk alapján. Így a Th4 izolátumok a *Trichoderma aggressivum* sp. nov., illetve a Th2 izolátumok a *T. aggressivum* f. sp. *europaeum* új fajneveket kaptak.

MÁNDOKI MÍRA¹, DOBOS-KOVÁCS MIHÁLY¹, BAKONYI TAMÁS², KECSKEMÉTI SÁNDOR³, IVANICS ÉVA⁴, RUSVAI MIKLÓS¹

A csirkék fertőző nephritisét okozó vírus magyarországi törzseinek összehasonlító vizsgálata

SZIE AOTK ¹Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék; ²Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék, Budapest; ³Debreceni Állategészségügyi Intézet, Debrecen; ⁴Országos Állategészségügyi Intézet, Budapest

A csirkék napos kori elhullásra vezető bántalmi közül fontos megemlíteni a köszvényt, aminek hátterében – a vízhiány illetve takarmányozási ártalmak mellett - gyakran a vesehámsejtek elfajulása áll. A vesében megfigyelt elváltozások oktanában többek között vírusos betegségek is szerepet játszhatnak. A hazai baromfitelegeken vizsgált napos csirke hullákban talált elváltozások alapján évek óta gyanítottuk az *Avian Nephritis Virus* (ANV, *Astroviridae*) magyarországi jelenlétét.

A betegségre gyanús hullák kórbonctani és kórszövettani diagnosztikai vizsgálata után kiegészítő elektronmikroszkópos vizsgálatot végeztünk, amely során kb. 28 nm nagyságú, ötágú csillagra emlékeztető alakú, ikozaéder nukleokapsziddal rendelkező virionok jelenlétét mutattuk ki a tubuláris epithel sejtekben.

A fertőzöttségre gyanús hullákból veseoszövet mintákat gyűjtöttünk, amelyet homogenizáltunk és RNS-t tisztítottunk belőlük. A génybankban közölt ANV teljes genomszekvencia (NC_003790) alapján, az 5' nem kódoló régióra tervezett primerek segítségével a mintákat RT-PCR vizsgálatoknak vetettük alá. A képződött, kb. 300 bázispár hosszúságú termékeken direkt nukleinsav-szekvencia meghatározást hajtottunk végre. A szekvencia a legnagyobb, 92 %-os hasonlóságot az ANV-hoz mutatta.

A specifikus RT-PCR segítségével az állategészségügyi diagnosztikai intézetekben őrzött korábbi vizsgálati anyagokban, valamint számos, nephritisben szenvedő csirkeállományban vizsgáltuk az ANV jelenlétét.

A továbbiakban a vírus hazai elterjedtségének feltérképezésén túl, különös figyelmet szeretnénk szentelni a kórokozó megbetegítő képességének vizsgálatára és a magyarországi vírustörzsek filogenetikai jellemzésére.

MARÁZ ANNA

Molekuláris mikológiai diagnosztika - lehetőségek és kihívások

BCE ÉTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék, Budapest

A mikrogombák gyors és pontos identifikálása és tipizálása számos területen egyre fontosabb és sürgetőbb igényként jelentkezik elsősorban ott, ahol a gombák jelenléte káros, minőségrontó vagy kórokozó hatású áll összefüggésben. Nem elhanyagolható azonban a gombák élelmiszeripari, gyógyszeripari, mezőgazdasági vagy környezetvédelmi alkalmazása során az adott technológiában alkalmazott gombák faj vagy törzs szintű jellemzésének, a folyamatban résztvevő gombák gyors és megbízható felismerésének, meghatározásának igénye sem.

A gombák molekuláris diagnosztikájában ezeknek az igényeknek a kielégítését – hasonlóan más mikroorganizmusokhoz – a genom-szintű vizsgálati módszerek közelítik meg leginkább. A genomot felépítő nukleinsavak (DNS, vírus eredetű RNS molekulák), valamint ezek expressziós termékeinek (mRNS, proteinek) vizsgálata és meghatározása a módszerek rohamos fejlődésével új távlatokat nyitott a mikológiában is: a genomika és proteomika eszköztárát és alap kutatási eredményeit.

A genom-szintű molekuláris technikák közül a ma már klasszikusnak tekinthető, a sejtekből kivont kromoszómális, mitokondriális vagy virális nukleinsavak intakt molekulákként vagy a restrikciós endonukleázos emésztéssel előállított fragmentumok egyszerű vagy pulzáló gélelektroforézissel kapott mintázatának meghatározása – kariotipizálás és RFLP analízis – nagyban hozzájárultak a gombák genomjának megismeréséhez, a fajok elhatárolásához vagy éppen összevonásához. Ezeknek a technikáknak fontos szerepük volt a pontos identifikálásban és a törzs-szintű tipizálásban is. Kezdetét jelentették a molekuláris epidemiológia kialakulásának humán, állati vagy éppen növénykórtani területeken.

A molekuláris diagnosztikában igazi áttörést a PCR alapú technikák bevezetése és fejlődése jelentette, amelyek kezdetben elsősorban a tiszta tenyészetként előállított izolátumok vizsgálatára terjedtek ki, jelentősen lerövidítve a pontos identifikálás és tipizálás idejét. A kifejlesztett és interneten elérhető –

elsősorban az rDNS nagy alegységének D1, D2 doménjára alapozott - molekuláris szekvencia adatbankok segítséget jelentenek ehhez, azonban a direkt szekvenálás a rutin diagnosztikában kevésbé használható. A PCR amlifikálással előállított rDNS szekvenciák restriktív enzimes analízise azonban gyors, pontos és robusztus technikát jelent a tiszta tenyészetekként előállított gombák identifikálásában. Ehhez nemzetközi, internetes adatbankok is használhatók, de akár egyetlen laboratórium is létrehozhatja a leggyakoribb kimutatandó és identifikálendő gombafajok molekuláris adatbankját.

Patogenitással, virulenciával kapcsolatos gének kimutatásához a PCR technikát általában hibridizációval kötik össze a PCR termék kimutatása céljából, amely számos patogén gomba esetében kifejlesztésre került, rutin diagnosztikai célú alkalmazása azonban esetleges.

A jövő lehetősége a DNS chipok vagy másnéven microarray technika alkalmazása rutin diagnosztikai célra, amely a specifikus és gyors diagnosztika mellett egyidejűleg több faj vagy törzs kimutatását, valamint a virulencia gének expressziójának mennyiségi vizsgálatát is lehetővé teszi.

MARÁZ ANNA

Ferenczy Lajos, az iskolateremtő professzor

BCE ÉTK Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék, Budapest

Ferenczy Lajos professzortól, aki a hazai mikrobiológusok közül sokunknak nemcsak tanára, hanem mestere is volt, szomorú szívvel vettünk örök búcsút április 16-án Szegeden. A megemlékezés felidézi annak a céltudatos, kemény akarattal és szívóssággal végzett tudományos iskolateremtésnek és tanszéképítésnek az állomásait, amelynek eredményeként a József Attila Tudományegyetem Növényélettani Tanszékéről 1953-ban indult gyakornok először az általa alapított Mikrobiológiai Tanszéki Csoportnak, majd pedig 1972-ben a Mikrobiológiai Tanszéknek vezetője lett.

Tudományos munkássága a növénykórtan területéről indult, és végigkísérte a mikológia iránti érdeklődése, annak magas szintű, igényes művelése.

A tudomány újdonságai iránti fogékonysága, a tudományos kíváncsiság kielégítése utáni vágy 4 Nature cikk publikálásában nyilvánult meg – és ami valóban egyedülálló – valamennyi hazai társszerzőkkel. Munkásságának legfontosabb állomásait talán ezek jelzik legjobban:

1. Varga, B.M., and L. Ferenczy. 1956. Effect of Rindite on the development of the growth-substances in potato tubers. *Nature (London)* 178: 1075.
2. Ferenczy, L., Kevei, F., and J. Zsolt. 1974. Fusion of fungal protoplasts. *Nature (London)* 248: 793-794.
3. Ferenczy, L., Sipiczki, M., and M. Szegedi. 1975. Enrichment of fungal mutants by selective cell-wall lysis. *Nature (London)* 253: 46-47.
4. Ferenczy, L., and A. Maráz. 1977. Transfer of mitochondria by protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature (London)* 268: 524-525.

Hazai és nemzetközi elismertségét a „Gomba Protoplaszt Metodika” kidolgozása, a protoplasztfúziós módszerrel elért tudományos eredményei alapozták meg és teljesítették ki. Ekkor kezdte virágkorát élni az a Tudományos Iskola Szegeden, amelyhez nekem is volt szerencsém tartozni és amelyet igyekezett mindig virágzásban tartani. Ebben nagy szerepet vállalt a Tudományos Iskola első gyakornoka, Kevei Ferenc, aki 1998-ban tanszékvezetőként utóda lett, követve és továbbépítve a tanszéket és a tudományt tavaly bekövetkezett, még mindig hihetetlen haláláig.

MÁRIALIGETI KÁROLY¹, KISS ISTVÁN FERENC², MAKK JUDIT¹

Tartósítási eljárások hatásvizsgálata a bakteriális túlélés kimutatásával modellrendszerben

¹ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszék; ²BCE Hűtő- és Állatiternék Technológiai Tanszék, Budapest

A tartósítási eljárások optimális esetben elpusztítják a mikroorganizmusokat az élelmiszerekben, de bizonyos szervezetek szubletális károsodást szenvedve túlélhetik a kezelést. A kezelés következtében a sérült sejtek esetleges regenerálódása potenciális veszélyeket rejthet magában (pl. romlást okozó baktériumok, kórokozó baktériumok elszaporodása), ezért ezek kizárása feltétlenül indokolt. Az élelmiszer-mikrobiológiai biztonság érdekében szükséges megismerni a szubletális mikrobiológiai hatást, a károsodás természetét, nagyságát, hogy ennek ismeretében megfelelő hatékony módszert,

eljárást lehessen kidolgozni.

Kutató munkánk során tápoldatos marhahúspép modellrendszerben vizsgáltuk a különböző kezelések (nagy hidrosztatikai nyomás [100-600 MPa, 1 - 4 x 5 perc], ionizáló sugárzás [1-4 kGy]) hatását, a mikroorganizmusok (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Deinobacter* sp., *Salmonella derby*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*) aktivitásának változását, a szaporodás kinetikai jellemzők alakulását, a szubletális károsodások nagyságát, a sérülések kijavítását a kezelések és a tárolási idő függvényében. A kezelések után, illetve egy hetes hűtőtárolást követően 96 lyukú mikrotitráló lemezekon tanulmányoztuk fényabszorpció mérés alapján (30 °C-on rázatással, 96 órán át 5 percenkénti mérésekkel) a húspépbe oltott baktériumok sejtsűrűség (492 nm-n) és a rezazurin redukciós kapacitás (620 nm-n) változását.

Megállapítottuk, hogy a kezelések után a mikroorganizmusok szaporodási görbéi a reduktív kapacitást mutató görbékkel jó párhuzamosságot mutatnak. A kapott diagramokon jól nyomon követhető, hogy a nyomástűrési értékek arányában a szaporodási görbék lag szakasza a kezelések dózis függvényében a legtöbb mikroorganizmusnál megnő, mind a nyomás értékek növelésével, mind a kezelések ismétlésének a számával. Ezzel jó egyezést mutat a maximális sejthozam is. Ennek alapján a baktériumtörzseket két csoportra lehet osztani, az egyikbe az *E. coli*, *S. derby*, *L. monocytogenes* és az *E. faecalis*, a másikba a lag szakasz idejének csökkenését, illetve némi sejt hozamnövekedést mutató *P. aeruginosa* és a *Deinobacter* sp. sorolható. Ez a jelenség, összehasonlítva a kezelést követően közvetlenül határozottabbnak mutatkozik a kezelést követő 9. napon történt méréseknél. A sugárkezelést túlélő mikroorganizmusoknál a szaporodás lag szakasza egyértelműen megnő, valamint 8 napos inkubáció után csak a *L. monocytogenes* és *E. coli* estén mutattunk ki gyenge növekedést.

MARTIN ANDREA, *MICSINAI ADRIENN, TABAJDINÉ PINTÉR VERONIKA

PCR alapú diagnosztikai módszerek fejlesztése és validálása élelmiszerekben előforduló mikroorganizmusok kimutatására

Dr. E. Wessling Kft., Budapest

A molekuláris biológia robbanásszerű fejlődése ellenére az élelmiszerhez kapcsolódó kórokozó baktériumok kimutatása a mindennapi gyakorlatban leginkább hagyományos mikrobiológiai módszerekkel történik, melyek sokszor több napot is igénybe vehetnek. Vizsgálataink célja, hogy *Salmonella* és *Campylobacter* fajokra, illetve *Listeria monocytogenes*-re specifikus PCR alapú diagnosztikai eljárások alkalmazhatóságát megvizsgáljuk. Ennek során a minta-előkészítéshez szükséges dúsítási eljárások optimalizálását, azok a „downstream” molekuláris biológiai alkalmazásokhoz való alkalmasságukat mértük fel. Törzsgyűjteményi és valós mintákból származó baktériumtörzsek felhasználásával szakirodalomban közölt eljárásokat validáltunk. A *Salmonella* fajok kimutatásában az invA génre specifikus primerek és egy, a reakcióban alkalmazandó belső pozitív kontrollt tartalmazó PCR reakciót magába foglaló eljárást optimalizáltunk. Célunk, hogy további PCR-alapú eljárásokat vizsgáljunk és fejlesszünk, amelyek a rutin élelmiszer-mikrobiológiai kimutatási folyamatot meggyorsítják, illetve annak megbízhatóságát növelik.

MATIZ KATALIN¹, URSU KRISZTINA², KECSKEMÉTI SÁNDOR¹, BAJMÓCY ENDRE¹, KISS ISTVÁN¹

Kelet-Magyarországon 1988 és 2003 között izolált rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) törzsek filogenetikai vizsgálata

¹Debreceni Állategészségügyi Intézet, Debrecen; ²Országos Állategészségügyi Intézet, Budapest

Az RHDV a *Caliciviridae* család *Lagovirus* nemzetségének tagja. A vírus az *Oryctolagus cuniculus* nemzetségbe tartozó nyulakat betegíti meg, de beszámoltak nem patogén törzsről is, mely a rabbit calicivirus (RCV) elnevezést kapta. Az RHDV egyetlen szerotípusán kívül egy ún. „RHDVa” altípusát különböztetjük meg. A törzsek RNS szekvenciája nagymértékben konzervatív. Az alacsony szintű genetikai variabilitás ellenére azonban jól meghatározható genocsoportokat azonosítottak a korábbi filogenetikai vizsgálatok során. Napjainkig mindössze egyetlen 1990-ből származó magyar izolátum összehasonlító vizsgálatát végezték el.

Célunk az volt, hogy adatokat nyerjünk a magyarországi RHDV törzsek genetikai variabilitására vonatkozóan. Vizsgálatainkhoz a Debreceni Állategészségügyi Intézetben 1988 és 2003 között összegyűjtött, - kórbonctani, kórszöveti és hemagglutináció gátlási próbával igazoltan nyulak vérvérzéses megbetegedésében elhullott állatokból származó házinyúl májmintákat használtunk fel. Összesen 27, 12 évet reprezentáló törzset vizsgáltunk meg. A filogenetikai vizsgálatot a VP60 capsid proteint kódoló gén részleges szekvencia analízisével végeztük el. A szekvencia adatokat az általunk kidolgozott RHDV specifikus primer pár segítségével nyert PCR fragmentek direkt szekvenálásával nyertük. A 27 magyar izolátum mellett 1 cseh, 2 francia, és 1 spanyol RHDV törzs, 2 francia és 1 német „RHDVa” altípusba tartozó törzs, valamint az RCV 528 bp hosszúságú homológ szekvenciáit hasonlítottuk össze a Phylip v 3.5c (Felsenstein, 1989) programcsomag segítségével. A törzsfa gyökerének az RCV-t választottuk. Az alkalmazott elemzési módszertől (parsimony, neighbour-joining) függetlenül az izolátumok három genocsoportját állapítottuk meg. Az első csoportba az 1988 és 1993, a második csoportba az 1994 és 2002 között gyűjtött magyar és külföldi izolátumok tartoznak, míg a harmadik csoportot a három ismert „RHDVa” altípusba tartozó törzs mellett a 2003-ból származó egyetlen magyar izolátum alkotja, amely az eredmény alapján nagy valószínűséggel szintén ebbe az altípusba tartozik. Eredményeink azt mutatják, hogy 1993 és 1994 között egy új RHDV törzs jelent meg a magyar nyúlpopulációban, ami a korábban jelenlévő törzsektől eltérő evolúciós úton fejlődött. A 2003-as izolátum azt sugallja, hogy hazánkba is eljutott az „RHDVa” altípusa. Elterjedtségének mértékét nem tudjuk megállapítani, de számolhatunk azzal, hogy a közeljövőben fokozatosan kiszorítja az országban lévő RHDV törzseket. Kísérleti úton igazolták, hogy bár az altípusban antigenitásbeli különbségeket is tapasztaltak a klasszikus RHDV törzsekhez képest, a forgalomban lévő vakcinák megfelelő védeltséget nyújtanak a megbetegedések ellen.

MEZEY ILONA, MITTLERNÉ TÓTH ETELKA

Aviditási vizsgálatok jelentősége humán parvovírus b19 fertőzésekben

Johan Béla OEK Általános Vírusdiagnosztikai Osztály, Budapest

Bizonyos állapotokban - terhesség, immunkárosodott betegek - fontos lehet egy aktuálisan lezajlott vírusfertőzés laboratóriumi tisztázása az IgM ellenanyag "eltűnését" követően is. E célra a jelentősebb vírusantigénekkal szemben termelődő ellenanyagokat külön-külön kimutató immunoblot próba vagy a specifikus IgG ellenanyag aviditásának, azaz antigén-determinánsához való kötődésének erőssége vizsgálható. Az IgG aviditását kereskedelmi forgalomból származó microelisa reagens-készlettel, enyhe denaturáló szerrel (8 M urea) történő elúcióval vizsgálták és az urea-kezelt és kezeletlen savómintákban mért OD értékek eltéréséből következtettek a frissen keletkezett, gyenge aviditású IgG jelenlétére a mintákban. Pozitívnak fogadták el a legalább 66%-os OD érték-csökkenést az urea-kezelt mintában. Céljuk volt, hogy a humán parvovírus B19 fertőzésekben az IgG aviditási próba felhasználhatóságának időbeli határait meghatározzák. Szerológiaiailag igazolt friss - azaz specifikus IgM pozitív - esetekből a megbetegedés után több héttel, több hónappal gyűjtött vérminták IgG aviditását vizsgálták meg: a gyenge kötődésű IgG ellenanyagok mintegy 3-4 hónapig mutathatók ki a keringésből. Az aviditási próba segítségével igyekeztek a fertőzés lehetséges idejét meghatározni patológiás terhességek illetve méhenbelüli fertőzés gyanúja miatt vizsgált újszülöttek eseteiben. Összesen 71 gravida vérmintáit vizsgálták kezdődő vagy lezajlott spontán vetélés, magzati ödéma, méhenbelüli elhalás, polyhydramnion, emelkedett AFP szint miatt. Az 58 esetben elvégzett specifikus IgM kimutató két esetben kétes, a többiben negatív eredményű volt; míg az IgG szintek igen magasnak bizonyultak mind a 72 mintában. Urea-kezeléssel 47 savóban mutattak ki gyenge aviditású specifikus IgG ellenanyagokat, mely a közelmúltban lezajlott fertőzésre utal. 24 mintából humán parvovírus B19 DNS kimutatóját is megkísérelték nested PCR próbával, 8 esetben viraemiát igazoltak. A 31 intrauterin fertőzésre gyanús (magzati vizenyő, veleszületett súlyos vérszegénység, illetve szív-ritmuszavar), 30 naposnál fiatalabb csecsemő savómintáiból az IgG aviditási próba 20 esetben utalt a közelmúltban lezajlott anyai fertőzésre. 24 csecsemő vérsavójából parvovírus B19 DNS kimutatója nested PCR próbával 8 esetben sikerült. Specifikus IgM ellenanyag-kimutató csak 8 vérsavóból készült, 7 esetben negatív és 1 esetben kétes eredménnyel. Az egyszerű microelisa vizsgálattal végzett IgG aviditási próba segíthet a régebben és az éppen lezajlott vírusfertőzések elkülönítésében, helyettesítheti a költséges immunoblot próbát. Segíthet a kockázatnak kitett gravidák felderítésében és gondozásuk tervezésében, ugyanakkor a

kockázatnak ki nem tett várandós anyák megnyugtathatók, a nem indokolt vizsgálatok elhagyhatók. Segítheti a humán parvovírus B19 fertőzések laboratóriumi diagnosztikáját a szükséges, egymást kiegészítő vírus-szerológiai és molekuláris virológiai módszerek összehangolásával, az ál-pozitív IgM eredmények leleplezésével. Az aviditási próbával nyert eddigi tapasztalatok egyéb vírusfertőzések laboratóriumi diagnosztikájában is felhasználhatók.

MISKEI MÁRTON¹, KARÁNYI ZSOLT², PÓCSI ISTVÁN¹, ROLF A. PRADE³

A sejtciklushoz kapcsolódó gének expressziós mintázatának változása *Aspergillus nidulans*-ban oxidatív stressz hatására

¹DE TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék; ²DE OEC 1. sz. Belgyógyászati Klinika, Debrecen, ³Department of Microbiology and Molecular Genetic

Az oxidatív stressz az egyik leggyakrabban előforduló stressz a természetben, hiszen minden aerob organizmus a légzése során különféle reaktív oxigén fajtákat termel, amelyek károsíthatják az élőlény DNS-ét. A legtöbb stressz, köztük az oxidatív stressz is befolyásolja az élőlények sejtciklusát. Mivel a sejtciklus az élőlények egyik legalapvetőbb folyamata, ezért az oxidatív stresszhatásra itt történnek a legjelentősebb és legfinomabban szabályozott változások, válaszreakciók.

Kísérleteinkben DNS microarray technika segítségével vizsgáltuk, milyen genomi szintű expressziós mintázatbeli változások történnek oxidatív stressz hatására az *Aspergillus nidulans* fonalas gombában. Jól megalapozott élettani kutatások után kiválasztottunk három oxidatív stresszt kiváltó anyagot: hidrogén-peroxidot (75 mM), diamidot (1.8 mM), menadiont (0.8 mM), amely anyagokkal az intracelluláris peroxid és szuperoxid koncentrációkban, illetve a glutation/glutation diszulfid redox egyensúlyban jól reprodukálható változások hozhatók létre. A kísérleteinkhez EST alapú DNS chip állt rendelkezésünkre, amely 4090 egyedi EST szekvenciát tartalmazott. Mindig kései exponenciális növekedési fázisú (16 h) *A. nidulans* tenyészeteket mostunk át friss, oxidatív stresszt generáló ágenseket tartalmazó tápközegbe, melyeket 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h vagy 9 h ideig inkubáltunk.

A transzkriptom analízise révén megállapítottuk, hogy a G1 és az S fázisban szerepet kapó gének indukálódnak, így a sejt átlép a restriktív ponton, megtörténik a replikáció, majd átjut a G2 fázisba. Az M fázisban, illetve a G2/M átmenetben szerepet kapó gének viszont represszálódnak. Ezek közül talán a legjellemzőbb az M fázisba való belépést gátló, de közben, az ebből való kilépést elősegítő fehérjék génjeinek indukciója. Így kialakulhat az úgynevezett G2/M blokk, amely lehetőséget biztosít a DNS-ben a replikáció során és az azt megelőzően keletkezett hibáknak a kijavítására. Ezt alátámasztja, hogy olyan gének is indukálódnak, melyek funkciója többek közt a DNS javítása.

MOLNÁR ANNAMÁRIA¹, SPENGLER GABRIELLA¹, WOLFART KRISZTINA¹, MASAMI KAWASE², NOBURU MOTOHASHI³, MOLNÁR JÓZSEF¹

Új proton pumpa gátló vegyület mozgásgátló hatásának vizsgálata proton pumpa deficiens *E. coli* törzseken

¹SZTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet, Szeged; ²Faculty of Pharmaceutical Sciences Josai University Sakado, Saitama, Japan; ³Meiji Pharmaceutical University, Tokyo, Japan

Számos baktérium aktív mozgását flagellumok biztosítják. A flagelláris mozgás mint virulencia faktor lehetővé teszi a gazdaszervezetbe kerülő patogén baktériumok számára, hogy a legkedvezőbb élőhelyet kemotaxis révén megközelítsék, majd kolonizálják.

A flagellumok mozgáshoz szükséges energiát a transzmembrán proton grádiens (ΔpH) és a membrán potenciál ($\Delta\psi$), azaz a "proton motive force" biztosítja. A transzmembrán protongrádiens létrehozásáért a plazmamembránban található ún. elsődleges proton pumpák felelősek. Irodalmi adatok szerint a transzmembrán proton grádiensben előidézett változások befolyásolják a baktériumok flagelláris mozgását, tehát a bakteriális mozgás gátlása lehetőséget nyújthat az adott patogén virulenciájának csökkentésére. Korábbi kísérleteink bizonyították, hogy az újonnan kifejlesztett trifluorometil keton származék a TF18 (2-benzoxazoyl-9-3,3,3-trifluoro-2-propanon), jelentős antibakteriális hatással rendelkezik, valamint proton pumpa gátló hatása is bizonyítást nyert *H. pylori* törzseken. Továbbá, a TF18 és a promethazin kombinációja jelentős szinergizmust mutatott a proton pumpát hordozó *E. coli*

törzsön, mindezek alapján arra következtettünk, hogy a TF18 befolyásolja a proton motive erőt. Kísérleti munkánk célja volt a TF18 flagelláris mozgásra gyakorolt hatásának tanulmányozása. Vizsgálatainkat egy proton pumpa hordozó *E. coli* AG100 és egy proton pumpa deficiens AG100A törzssel végeztük. Különböző TF18 koncentrációk jelenlétében a két *E. coli* törzs mozgás változását fázis kontraszt mikroszkóppal követtük nyomon. A mozgás gátlás mértéket az úszó, bukfencező és a nem mozgó sejtek kontrollhoz viszonyított aránya alapján határoztuk meg. Eredményeink szerint a TF18 hatékonyan gátolta a proton pumpa hordozó *E. coli* AG100-as törzs mozgását, míg a proton pumpa hiányos törzs mozgását nem befolyásolta jelentősen. Kísérleti adataink alapján feltételezzük, hogy az újonnan szintetizált trifluorometil keton származék a transzmembrán proton gradiens megbontása révén, a proton motive erő csökkentésével fejt ki mozgást gátló hatását. A pontos működési mechanizmus felderítésre még további kísérletek szükségesek.

MOLNÁR ZSOLT, EMRI TAMÁS, VERES TÜNDE, PUSZTAHELYI TÜNDE, DUDÁS GÁBOR, PÓCSI ISTVÁN

A 2-dezoxi-D-glükóz és az E-vitamin hatása az *Aspergillus nidulans* autolízisére és sporulációjára
DE TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék, Debrecen

A gomba autolízis szénforrás-függő és redox szabályozásának megismerése érdekében a 2-dezoxi-D-glükóz és az E-vitamin autolízisre gyakorolt hatását tanulmányoztuk egy vad típusú (FGSC26) és egy *creA* null mutáns (karbon katabolit represszióban sérült) törzsben.

A *creA* null mutánsban a kontroll FGSC26 törzshöz képest gyorsabb autolízist figyeltünk meg: Nemcsak a szárazanyag tartalom csökkent lényegesen gyorsabban a mutánsban de ez a törzs mintegy 10-20-szor több extracelluláris autolítikus (kitináz és proteáz) termelt a kontrollhoz viszonyítva. Meglepő módon a 2-dezoxi-D-glükóz nemcsak az FGSC26-os, de a *creA* null mutáns törzsben is gátolta az autolízist, ami a lényegesen gyengébb extracelluláris hidroláz termelésben és a szárazanyag tartalom lassabb csökkenésében is megmutatkozott. Felületi tenyészetekben a 2-dezoxi-D-glükóz nemcsak az autolízist, de a sporulációt is gátolta mind a FGSC26, mind a *creA* null mutánsban.

Az E vitamin a 2-dezoxi-D-glükózhoz hasonlóan gátolta az autolízist és a sporulációt mindkét törzsben, a gátlás mechanizmusa azonban eltérő volt. A kvantitatív RT-PCR-rel végzett transzkriptom vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy a 2-dezoxi-D-glükóz mind a *chiB* (extracelluláris kitináz), mind a *prtA* (proteáz) géneket represszálta, míg az E vitaminos kezelés esetében az mRNS szintekben lényeges eltérést nem tapasztaltunk.

Ismert, hogy a *brlA* gén részt vesz a sporuláció iniciálásában és - előkísérleteink alapján - a kitináz termelés szabályozásában is. A 2-dezoxi-D-glükóz - az E vitamintól eltérően - gátolta *brlA* gén indukcióját mindkét törzsben, ami megmagyarázza a sporulációra és a kitináz termelésre gyakorolt hatását is. Megfigyeléseink alapján a proteáz termelés szabályozásában a *brlA* gén nem vesz részt, így a 2-dezoxi-D-glükóz feltehetőleg egy másik szabályzási útvonalon keresztül fejt ki a gátló hatását. A *prtA* gén repressziója igen hasonló kinetikát mutatott az *afIR* (a sterigmatocisztin termeléshez szükséges gének transzkripció faktor) gén repressziójához. Tekintve, hogy mind a *brlA* mind az *afIR* gének a FadA heterotrimer G-protein - protein kináz A (Pka) szignál által szabályozottak, feltételezzük, hogy a 2-dezoxi-D-glükóz mind az autolítikus hidrolázok mind a sterigmatocisztin termelését ezen szignál transzdukciós útvonalon keresztül befolyásolta.

Összességében elmondhatjuk, hogy bár a várakozásnak megfelelően a CreA fehérje ténylegesen részt vesz az autolítikus hidrolázok termelésének szabályozásában, a glükóz képes gátolni az autolízist és a sporulációt a CreA-tól függetlenül is. E represszió részben a *brlA* indukciójának gátlásán keresztül valósul meg, de egy harmadik, a *creA* és a *brlA* génektől független útvonal is létezik. Az E vitamin, bár a 2-dezoxi-D-glükózhoz hasonlóan effektíven gátolta mind az autolízist, mind a sporulációt, a 2-dezoxi-D-glükóztól eltérően feltehetőleg csak poszttranszkripció szinten fejtette ki hatását.

MURVAI MELINDA¹, BORBÉLY ÁGNES ANIKÓ², GERGELY LAJOS^{1,2}, VERESS GYÖRGY²

A humán papillomavírus (HPV), a cervix carcinoma és az ec adherin gén polimorfizmus kapcsolata

¹DE-MTA Tumorsejt Kutatócsoport; ²DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Debrecen

A cervix carcinoma a 2. leggyakoribb női daganat világszerte. Epidemiológiai adatokból köztudott, hogy a humán papillomavírust (HPV) gyakran mutatják ki cervicális intraepithelialis neoplasiából és invazív cervix carcinomából. Mivel a cervix premalignus elváltozásainak csak kis hányada fejlődik invazív carcinomává, fontos azonosítani a cervikális carcinogenezis során bekövetkező genetikai és epigenetikai történéseket is.

Az E-cadherin 120 kDa-os transzmembrán glikoprotein. Szerepet játszik a sejtek polaritásának kialakulásában és a szöveti struktúra felépülésében. Az E-cadherin diszfunkciója számos humán betegségben megfigyelhető, mint pl. az endometriózis, Crohn betegség, policisztás vesebetegség. A tumorprogresszió során az E-cadherin expressziójának elvesztése összefüggésben van a humán carcinomák differenciációjával: jelen van a differenciált, nem invazív carcinomákban, de expressziója csökken a kevésbé differenciált invazív tumorokban.

A tumorszuppresszor gének inaktivációja pontmutáció, kromoszóma deléción, illetve a promóter hipermetilációja miatt jöhet létre. A leggyakoribb humán genetikai eltérés az egyedi nukleotidot érintő polimorfizmus (single nucleotide polymorphism, SNP): 1000 bázisból átlagosan 1-et érint a genomban. A transzkripció kezdőhelyétől számított -160 nukleotidnál található SNP (C/A) polimorfizmus megváltoztatja a promóter erősségét és a transzkripciós faktorok kötődését, emellett közvetlen hatása van az E-cadherin gén transzkripciójára: az A allél jelentősen kisebb transzkripciós aktivitással rendelkezik a C allélhoz viszonyítva. Ez az allélvariáció egy potenciális genetikai marker, melynek segítségével azonosíthatóak azok a betegek, akik megnövekedett kockázattal rendelkeznek az invazív/metasztázisra való megbetegedésekre nézve.

Munkánk célja megvizsgálni, milyen a különböző allélok (-160 C/A) gyakorisága a HPV-pozitív rákmegelőző elváltozásokban a HPV-negatív szövetekhez képest, és hogy bármelyik allél dominanciája megnövekedett kockázatot jelent-e a cervix malignus elváltozásaira nézve.

Tanulmányozni kívánjuk azt is, hogy van-e összefüggés a méhnyak rákmegelőző elváltozásaiban az E-cadherin promóter metilációja, illetve a CDH1 (E-cadherin) gén heterozigótaságának elvesztése és a HPV fertőzés között.

MUZSLAY MÓNKA¹, KONKOLY-THEGE MARIANNE², SZÉKELY ÉVA², PÁSZTI JUDIT¹

A multirezisztencia kiszélesedésének nyomonkövetése: panrezisztens *Pseudomonas aeruginosa* izolátumok karakterizálása fenotípus- és genotípusvizsgálattal

¹Johan Béla OEK Fágvizsgáló és Molekuláris Epidemiológiai Osztály; ²Szent László Kórház, Budapest

A *Pseudomonas aeruginosa* közismert tulajdonsága, hogy számos, egyéb Gram-negatív baktériumra hatékony szerrel szemben természetes rezisztenciát mutat. A magas letalitású *P. aeruginosa* infekciók kezelését nehezíti az a jelenség, hogy mutáció vagy átvitelhető genetikai elemek megszerzése révén a viszonylag kevés rendelkezésre álló antipseudomonas hatású szerrel szemben egyre több izolátum szerez rezisztenciát. Hazánkban az utóbbi 2 évben bukkantak fel olyan panrezisztens izolátumok, amelyek csak 1-2 antipseudomonas szerre voltak érzékenyek. Olyan törzsek is előfordultak, amelyekre csak az 50-es évek elavultnak tartott antibiotikumai, a polymyxin volt hatékony. Egy vese- és májtranszplantált, hemodializált beteg négy hónapon át tartó ápolása során különböző váladékaiból tenyésztett ki *P. aeruginosa*, amely kezdetben csak néhány antipseudomonas szerre volt rezisztens. A hosszas antibiotikum kezelés eredményeképpen a halála előtt vett hemokultúrájából kitenyésztett törzs a polymyxin kivételével valamennyi antibiotikumra rezisztens volt. A törzsek ismételt vizsgálata során az eredetitől eltérő rezisztenciaképet kaptunk, valamint az E-test-ek gátlási ellipszisében megjelenő rezisztens telepek is változatos telepmorfológiát és rezisztenciaképet mutattak. Valamennyi vérből izolált törzs és 5 eltérő rezisztenciájú telepmorfológiai variáns fág és pyocintípusát meghatároztuk. Fágérzékenység alapján a törzsek három (2/119x/352; 16/68/109; 16), a termelt bakteriocin (pyocin) típusa alapján kétféle csoportba tartoztak (3nb3 és 2f). Valamennyi izolátum plazmidmentesnek

bizonyult. PCR alapú (ERIC2) tipizálás során az amplifikált termékek elektroforetikus mintázata sem mutatott különbséget a minták között. Pulzálatott mezejű gélelektroforézist (PFGE) SpeI restriktációs enzimmel történt kromoszóma emésztést követően végeztünk. A termékek száma és mérete alapján valamennyi izolátum azonos pulzotípusba tartozott. Minden egyes törzs hordozott egy 750 bp nagyságú integront, mely szekvencia meghatározás alapján aadB gént kódol, ami gentamicin, tobramycin, kanamycin rezisztenciát eredményez. A vizsgálatok bizonyították, hogy a beteg hónapokig fennálló fertőzését egyetlen törzs okozta, és nem különféle törzsekkel fertőződött. A rutin érzékenységi vizsgálatokkal nem lehetett megbízhatóan kimutatni a populációban jelen lévő rezisztensebb vagy panrezisztens egyedeket: a beteg a leletek alapján változtatott, megfelelőnek vélt terápia ellenére meghalt. Fenotípusos vizsgálatainkban regisztrálni tudtuk a törzs változását: a bakteriális sejtfal változását jól jelezte a telepmorfológia ill. a fágokkal szembeni érzékenység változása. A PCR alapú tipizálással és a makrorestriktációs analízissel mutációt nem tudtunk detektálni.

NAGY ERZSÉBET

Az anaerob baktériumok okozta fertőzések molekuláris diagnosztikája

SZTE ÁOK Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet, Szeged

Az anaerob baktériumok okozta fertőzések rutin laboratóriumi diagnosztikájának számos nehézsége van. A fertőzések egy jelentős része vegyes endogén fertőzés, ahol a szervezet normál flóráját alkotó anaerobok kerülnek olyan élettérbe, ahol más aerob vagy fakultatív anaerob baktériumokkal együtt okoznak kórképet. A monobakteriális anaerob infekciók döntően toxintermelésük következtében váltják ki a klinikai tüneteket. Mindkét csoportba tartozó kórképek nem megfelelően megválasztott antibakteriális terápia esetén súlyos életet veszélyeztető kórképhez vezethetnek. Az anaerob baktériumok speciális igényekkel rendelkeznek az *in vitro* tenyésztés során, szaporodásuk sok esetben jelentősen lassabb, mint az aerob baktériumoké. Számos, ma már igazoltan patogén anaerob baktérium mesterséges körülmények között gyakorlatilag nem tenyészthető. A molekuláris genetikai módszerek hozzáférhetősége, az ismeretek bővülése forradalmasította az anaerob baktériumok okozta fertőzések diagnosztikáját, a patogenitási tényezők, az antibiotikum rezisztencia gének elterjedését és a génexpressziót befolyásoló tényezők jobb megismerését. A periodontitis kulcs baktériumainak kimutatása során, a target szekvenciák amplifikálása és megfelelő próbákkal történő hibridizációt követően szemikvantitatív módon értékelhető jelenlétük közvetlenül a vizsgálati anyagban. Ugyan ezen baktériumok az orális folyamat, mint fokális infekció következményeként távoli szövetekben okozhatnak acut vagy krónikus gyulladást. Csak molekuláris genetikai módszerek segíthetnek a diagnózisban. A *C. difficile* mint egyik leggyakoribb nozokomiális infekció járványügyi jelentőségét megfelelő módon tanulmányozni hagyományos tipizáló módszerek hiányában csak molekuláris módszerekkel lehet. Saját vizsgálataink bizonyítják, hogy a hazai járványos törzsek között más ribotípusok fordulnak elő domináló módon, mint Európa más országaiban. Ma már egyre komolyabb kutatások folynak az anaerob baktériumok antibiotikum rezisztencia kérdésének körében is. Ma már egyre nagyobb százalékban találunk a kutató "silent" formában carbapanem, metronidazol rezisztencia géneket az inféziós kórképekből izolált gyakori kórokozók (így a *Bacteroides fragilis* csoport tagjai) között, de igazolták ezen gének jelenlétét a normál széklet flóra tagjaiként a bélben élő egyedekben is. A normál flóra tagjai között végbemenő géntranszfer, a mobilis IS elemek megjelenése egyes rezisztencia gének közelében (mely a rezisztencia expressziójához elengedhetetlen) igazolja a domináló anaerob flóra tagjainak szerepét az antibiotikum rezisztencia terjedésében.

NAGY ETELKA, CSOMA ESZTER, BECK ZOLTÁN

A *p16^{INK4A}* és *p14^{ARF}* gének genetikai és epigenetikai változásai epstein–barr vírus által transzformált b-sejtvonalakban

DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Debrecen

Az *INK4A* gén, amely a *p16^{INK4A}* és *p14^{ARF}* tumor-szuppresszor fehérjéket kódolja, gyakran inaktivált a humán tumorokban. Vizsgálataink során Epstein-Barr vírus (EBV) által transzformált lymphoblastoid (LCL) és EBV pozitív illetve negatív Burkitt lymphomákból (BL) származó sejtvonalakban

tanulmányoztuk az *INK4A* gén genetikai és epigenetikai eltéréseit. A $p16^{INK4A}$ és $p14^{ARF}$ tumor-suppresszor génekben bekövetkező delécióit polimeráz láncreakció-egyszálú konformációs polimorfizmus (PCR-SSCP) technikával vizsgáltuk. A $p16^{INK4A}$ exon 1, 2, 3 és $p14^{ARF}$ exon 1 szekvenciákat ABI reakció kit segítségével, automata szekvenálással határoztuk meg. A $p16^{INK4A}$ és $p14^{ARF}$ gének promoter hipermetilációját metiláció-specifikus PCR alkalmazásával mutattuk ki.

PCR-SSCP analízissel az *INK4A* génben delécióit egyetlen LCL vagy BL sejtben sem, és heterozigóta mutációt is csak néhány BL sejtvonalon tudtuk kimutatni. A $p16^{INK4A}$ promoter hipermetilált állapotban volt valamennyi EBV+ és EBV- BL sejtvonalon. Aberráns $p14^{ARF}$ promoter metilációt nem tudtuk kimutatni a BL mintákban. Mindkét promoter együttes metilációját figyeltük meg az 5 LCL közül 4 esetben, melyek közül egyben a $p14^{ARF}$ csak részlegesen volt metilált. A $p14^{ARF}$ metilációt nem mutató mintában is részleges $p16^{INK4A}$ promoter hipermetilációt tudtuk kimutatni. A *de novo* immortalizált LCL-ekben és a normál B sejtekben a $p16^{INK4A}$ és $p14^{ARF}$ gének nem voltak metiláltak. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a BL sejtvonalakban a $p16^{INK4A}$ gén-, illetve az LCL-ekben a $p16^{INK4A}$ és $p14^{ARF}$ gének promoter metilációja fontos szerepet játszhat a sejtek immortalizációjában, de ezek a változások valószínűleg a tumor kifejlődésében a vírus okozta transzformációt követő másodlagos történések.

NAGY SZILVIA^{1,5}, MOLNÁR NÓRA², ERŐS ZSOLT³, NAGY CSABA³, RÉVAY ÁGNES⁴, VARGA ZOLTÁN⁵, PÓCSI ISTVÁN¹, JAKUCS ERZSÉBET³

A kartonfészeképitő hangya (*Lasius fuliginosus*) szimbióta gombájának taxonómiai revíziója

¹DE TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék, Debrecen; ²SZTE Ökológiai Tanszék, Szeged; ³ELTE TTK Növény szerkezettani Tanszék; ⁴MNM Növénytár, Budapest

A hazánkban is előforduló *Lasius fuliginosus* kartonfészeképitő hangya fészkeben tiszta tenyészetben előforduló gombát első ízben Fresenius írta le 1852-ben *Septosporium myrmecophilum*ként. Többszöri átnevezés után a gombát Elliott *Cladosporium myrmecophilum*nak nevezte el 1914-ben (1).

Elsődleges célunk a több mint 100 évvel korábban morfológiai alapon leírt gombafaj újbóli vizsgálata volt molekuláris biológiai módszerekkel. Mind a fészekanyagból, mind a gomba fajból a DNS kivonása után a rDNS ITS szekvenciáit PCR-amplifikációt követően analizáltuk. A rendelkezésre álló gomba ITS szekvenciákból "neighbour joining fa bootstrap" analízissel (2) filogenetikai törzsfákat szerkesztettünk. Az eredmények alapján megállapítható, hogy ez a gombafaj nem a *Cladosporium* genusba tartozik, hanem sokkal inkább mutat hasonlóságot a *Dactylaria purpurella* és a *Scolecobasidium humicola* fajokkal.

Vizsgáltuk továbbá, azt a jelenséget, hogy a *Cladosporium myrmecophilum* kizárólag tiszta tenyészetben fordul elő e hangyafaj fészkeben. Ennek oka valószínűleg az, hogy a hangyák erős antifungális anyagot, 3-formyl-7,11-dimethyl-(2E,6Z,10)-dodecatrien-1-olt, választanak ki (3). A hipotézis tesztelésére *Lasius fuliginosus* hangyákat helyeztünk *Helminthosporium sativum* és *Rhizopus stolonifer* felületi tenyészetekre, melyek telepei ezt követően hamarosan nekrotizálódtak.

NAGY VIVIÁNA¹, SZAKÁCS GYÖRGY¹, ASHOK PANDEY²

***Trichoderma harzianum* izolátumok kitináz enzimtermelésének vizsgálata szilárd fázisú fermentáció alkalmazásával**

¹BME Mezőgazdasági Kémiai Technológiai Tanszék, Budapest; ²Regional Research Laboratory Biotechnology Division CSIR, Trivandrum, India

A kitin, az N-acetil-D-glükózamin homopolimerje a természetben a cellulóz, hemicellulózok és a lignin után a legnagyobb mennyiségben előforduló megújuló természetes anyag. Az iparban elsősorban mono-ill. oligoszacharidja miatt hasznosítják. A kitinbontó enzimek és kitináz termelő antagonistá fonalgombák a mezőgazdaságban is alkalmazhatóak, ú. n. biokontrol szerként. A *Trichoderma* nemzetségbe tartozó fonalgombák közül elsősorban a *Trichoderma harzianum* fajra jellemző az, hogy növénypatogén gombákon képes élősködni, különböző hidrolitikus enzimeivel segítségével károsítja a növénypatogén gomba sejtfalát.

Kitináz enzimtermelés céljából mintegy 40 *Trichoderma harzianum* izolátumot vizsgáltunk szilárd

fázisú fermentáció (SSF) alkalmazásával. A törzsek identifikálását klasszikus és molekuláris taxonómiai módszerekkel kanadai és osztrák kutatók végezték. A 3 és 5 napos fermentációhoz 4 különböző táptalajt alkalmaztunk, amelyek búzakarpa és kitinpor 9:1 arányú keverékét és különböző sóoldatokat tartalmaztak. A legjobb törzsek kitináz enzim termelése 2-6 IU/g szárazanyag volt.

Az eredmények alapján a legmagasabb aktivitást mutató TUB F-947-es törzssel fermentációs táptalajt, valamint idő optimalizálást végeztünk. Kísérleteink során a pótlólag adagolt C-források közül a kitinpor jelenléte nélkülözhetetlennek bizonyult a magasabb enzim aktivitás eléréséhez, a vizsgált alternatív mezőgazdasági melléktermékek közül a búzaszalma jobb szubsztrát-hordozó volt az izolátum számára, mint a szűrővizsgálatokhoz használt búzakarpa. A kitináz enzim működésének hőmérséklet optimuma 50°C-nak, pH optimuma 5,0-nak adódott.

A további kísérleteket együttműködésben végezzük a Regional Research Laboratory, CSIR, Trivandrum, India kutatóhellyel.

NÉMETH ÁRON, SEVELLA BÉLA

Glicerinszármazékok biotechnológiai előállítása

BME VMK Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék, Budapest

A glicerín egy napjainkban folyamatosan növekvő mennyiségben rendelkezésre álló megújuló nyersanyag. Az Európai Unióban egyre népszerűbb alternatív üzemanyag ugyanis a biodízel, amelynek gyártása során az olajos magvak növényolajának átészterezésekor a glicerín mint felhasználásra váró nyersanyag szabadul fel. E dinamikusan fejlődő iparág által egyre nagyobb mennyiségben felhalmozott glicerínből olyan iparilag értékes anyagok nyerhetők, mint a Reuterin (antibiotikum), az 1,3-dihidroxi-aceton (DHA, kozmetikai ipar) és az 1,3-propándiol (1,3-PD, műanyag ipar). A Reuterin a 3-hidroxi-propionaldehid (3-HPA) különböző formáinak egyensúlyi elegye, amely széles-spektrumú antibiotikus hatással rendelkezik. A DHA-t a kozmetikai ipar bőrbarnító ágensként használja, mert így a fogyasztó elkerülheti a nap UV sugárzásából eredő káros hatásokat. A legperspektivikusabb glicerín származék azonban az 1,3-PD, mert több mint 100.000 t/év mennyiségben kerül felhasználásra a kedvező tulajdonságú polimerek monomerjeként, és bár erőteljes kutatás folyik a biológiai előállítására, egyelőre még a szerveskémiai előállítás dominál. A biológiai előállításra irányuló kutatások fő irányvonala a különböző genetikailag módosított sejtekkel végzett de novo fermentáció. Mivel ez az eljárás élő sejteket használ, ezért a termék hozam mindig kisebb, mint 100%, mert a nyersanyag egy része a sejtekbe beépül. Tovább csökkenti a termékhozamot a sejtek által termelt számos egyéb anyagcsere termék, és ezek a feldolgozási műveleteket is megnehezítik. E problémák kiküszöbölésére az 1,3-PD-t enzimes biokonverzióval kívánjuk előállítani koenzim regenerációs folytonos üzemű membránreaktorban. A glicerint egyedüli szénforrásként hasznosítani képes mikroorganizmusok közül az *Enterobacter aerogenes* törzset használtuk enzimmegtermelőként, amelynek glicerín-dehidratáz (GDHt EC:4.2.1.30), 1,3-propándiol-oxidoreduktáz (1,3-PDOR EC 1.1.1.202) és glicerín-dehidrogenáz (GDH EC 1.1.1.6) enzimei szükségesek a glicerín hasznosításhoz, a célul kitűzött biokonverzióhoz. A tervezett folyamatban a glicerínről a GDHt egy vízmolekulát von el, majd a keletkezett 3-HPA-et NADH₂ segítségével az 1,3-PDOR redukálja propándiollá. A NADH₂-ből keletkezett NAD⁺-t a GDH redukálja vissza, miközben a glicerint DHA-vá oxidálja. Korábbi publikációinkban beszámoltunk arról, hogy sikerült az enzimek előállítására hatékony fermentációs eljárást kidolgozni [1], illetve működő koenzimregenerációs biokonverziót megvalósítani [2]. A biokonverzió azonban melléktermékeket is termelt, mert a tisztítatlan sejt extraktum, amellyel a biokonverziót végeztük, egy sor egyéb enzimet is tartalmazott. Ennek a komplex rendszernek a leírására egy összetett matematikai modellt állítottunk fel, amelynek adekvátságát kísérletekkel is igazoltuk.

[1] A. Németh, B. Kupcsulik and B. Sevela: 1,3-Propanediol oxidoreductase production with *Klebsiella pneumoniae* DSM2026. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19. pp. 659-663. (2003) [2] Németh Á., Kupcsulik B., Sevela B.: Többenzimes (membrán)reaktor modellezése Műszaki Kémiai Napok Veszprém (2004)

NGUYEN DUC QUANG¹, FRAGA ARAÚJO SÓNIA CRISTINA^{1,2}, REZESSYNÉ SZABÓ JUDIT M.¹, HOSCHKE ÁGOSTON¹

***Thermomyces lanuginosus* élelmiszeripari jelentőségű intracelluláris enzimeit**

¹BCE Sör- és Szeszipari Tanszék, Budapest; ²Universidade do Minho Departamento de Engenharia Biologica, Gualtar Braga, Portugalia

Az utóbbi évtizedekben intenzíven tanulmányozzák a termofil gombák enzimeit, hogy feltárják azok ipari alkalmazhatóságát. Irodalmi adatok alapján a *Thermomyces lanuginosus* termofil fonalas gomba nagy mennyiségben termel termostabilis, extracelluláris, cellulázmentes, valamint széles pH optimummal rendelkező xilánázts olcsó szénforrásokon pl. kukorica csutkán. E gomba a keményítő tartalmú tápközegeken extracelluláris termostabilis amilolitikus enzimeket is szintetizál. Az ipari eljárásoknál a termostabilis enzimek alkalmazásának számos előnye ismert. Ezek közül a biokonverzió sebességének növelése és a mikrobiológiai szennyeződések kockázatának csökkentése a legfontosabbak. A szakirodalomban kevés adat található a *Thermomyces lanuginosus* gomba intracelluláris enzimeiről. Jelen munkánkban néhány intracelluláris enzim (invertáz és β -galaktozidáz) termelését vizsgáltuk. Az invertáz - különösen az immobilizált invertáz enzimmészítmény - széles körben alkalmazható az élelmiszeriparban a szacharóz glükózzá és fruktózzá történő hidrolízisével. Napjainkban az invertáz segítségével előállíthatók frukto-oligoszacharidok, melyek prebiotikumként használhatók funkcionális élelmiszerek és élelmiszer-összetevők előállításánál. A gomba eredetű β -galaktozidázok élelmiszeripari jelentősége abban rejlik, hogy hidrolizálják a tejben és tejsavóban lévő laktóz β -(1,4) kötéseit glükózzá és galaktózzá, így a laktóz intoleránsok számára is fogyaszthatóvá válnak az ilyen tej és tejtermékek. Figyelemreméltó, hogy a β -galaktozidázok is alkalmazhatóak a transzgalakto-oligoszacharidok előállításában, melyek tudományosan bizonyítottan prebiotikus hatással rendelkeznek.

Hat *Thermomyces lanuginosus* törzs (ATCC 44008, ATCC 28083, ATCC 34626, CBS 395.62, IMI 131010, DSM 5826) invertáz termelésének vizsgálatát végeztük el. Az ATCC 28083 törzs bizonyult a legjobbnak, így a további kísérletekhez ezt a törzset választottuk. A maximális invertáz aktivitást a fermentáció 14-18 órájában tapasztaltuk. A tápközeg optimális szacharóz tartalma 2 (w/v) % volt. A glükóz gátolta az invertáz szintézisét, amely glükóz represszióra utal. A vizsgált nitrogénforrások közül a karbamid és az L-aszparagin bizonyult a legjobbnak.

A β -galaktozidáz enzim esetén két törzs, az ATCC 16455 és a CBS 395.62 mutatta a legjobb aktivitást. A tápközeg minden esetben tartalmazott laktózt induktorként, s az enzimaktivitások maximumát 2-3 napos tenyésztések után tapasztaltuk. A β -galaktozidáz termelés fokozására tápközeg optimalizációs kísérleteket végeztünk. Eredményként megállapítottuk, hogy a vizsgált szénforrások közül a keményítő a legkedvezőbb, nitrogénforrások esetén az élesztőkivonat alkalmazása során találtuk a legnagyobb biomassza hozamot. A β -galaktozidáz enzim előállítását léptéknövelést alkalmazva laboratóriumi fermentorban is megvalósítottuk.

Kísérleteink az OTKA T-042653 támogatásával készültek.

NÓGRÁDY NOÉMI¹, TÓTH ÁKOS², PÁSZTI JUDIT¹

Fágtípusok, antibiotikum rezisztenciák és az 1-es típusú integronok jelenléte 2002-2003-ban izolált humán eredetű, nem-typhoid Salmonella törzsek esetében

Johan Béla OEK ¹Fágtípusozási és Molekuláris Epidemiológiai Osztály, ²Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Budapest

A fág- és antibiotikum rezisztencia típusok és az 1-es osztályú integronok elterjedtségének felmérése céljából 1585 Salmonella törzset felölelő gyűjteményt vizsgáltunk meg. A törzseket a 2002-2003-ban humán salmonellózis esetekből izolált anyagból válogattuk össze úgy, hogy azok reprezentálják a leggyakrabban előforduló szerotípusokat (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Hadar* és *S. Virchow*). Minden törzsnek megállapítottuk a fágtípusát és az antibiotikum érzékenységét. A rezisztens törzsek 1-es típusú integron hordozását PCR módszerrel, a kimutatott integronok gén tartalmát szekvenálással határoztuk meg. A *S. Enteritidis* és a *S. Typhimurium* törzsek fágtípusát nemzetközi módszerekkel, a többi szerotípusát hazai sémákat követve állapítottuk meg. Az antibiotikum érzékenységi teszteket korongdiffúziós módszerrel végeztük a következő Oxoid korongokat használva: ampicillin (Amp), cefotaxim (Ctx), chloramphenicol (Chl), tetraciklin (T), streptomycin (Sm), gentamicin (Gm), kanamicin (Km), nalidixin sav (N), ciprofloxacin (Cip) és sumetrolim (Sum). A

cefotaxim rezisztens törzsek széles-spektrumú β -laktamáz (ESBL) termelését E-teszttel vizsgáltuk. A megvizsgált 337 *S. Enteritidis* törzs többsége (77%) a PT4 fágtípusba tartozott. Más gyakori fágtípus nem találtunk. A PT4 törzsek szinte kivétel nélkül egyetlen antibiotikumra, a nalidixin savra nézve bizonyultak rezisztensnek. A multirezisztens törzsek aránya alacsony volt (10.1%). Az integron hordozás sem volt jellemző, csupán négy törzs tartalmazott egy 1.0 kb méretű, 1-es típusú integront *aadA2* gén tartalommal. A vizsgált 1058 *S. Typhimurium* törzs 36%-a a DT104, 21%-a pedig a DT104-el rokon U302 fágtípusba tartozott. Az egyéb gyakoribb fágtípusok az RDNC, PT14, PT30, PT1 és a PT99 voltak. A *S. Enteritidis*-nél tapasztaltakkal ellentétben a multirezisztens törzsek aránya itt magasnak bizonyult (63%), ami szoros összefüggést mutatott a DT104 törzsek MDR (multi-drug resistance) szigetében kódolt 1.0 kb és 1.2 kb méretű integronjainak jelenlétével. Tíz cefotaxim rezisztens törzset találtunk, amelyek ESBL-termelőnek bizonyultak. A 99 megvizsgált *S. Infantis* törzs közül 93 bizonyult multirezisztensnek, streptomycin-tetraciklin-nalidixin sav rezisztenciákkal. Négy kivétellel valamennyi törzsben egy 1.0 kb méretű integront találtunk, amely *aadA1* gént kódolt. Egy kivétellel a 60 *S. Hadar* törzs a *S. Infantis* törzsekre jellemző rezisztencia képpel rendelkezett, de az 1-es típusú integron hordozás rájuk nem volt jellemző, csupán két törzsben találtunk egy 1.6 kb méretű integront *dhfrI* és *aadA1* típusú génkazettákkal. Egy kivétellel minden *S. Virchow* törzs multirezisztensnek bizonyult és rendelkezett a *S. Infantis*-nál vagy a *S. Hadar*-nál leírt, vagy egy 750 bp méretű, *dhfrV* gént tartalmazó integronnal. Munkánkkal szeretnénk információt nyújtani a humán megbetegedésekből leggyakrabban izolált Salmonella szerotípusoknál elterjedt fág- és antibiotikum rezisztencia típusokról, valamint felhívni a figyelmet a multirezisztencia egyre fenyegetőbb terjedésére, amelyben az integronoknak, mint mobilis genetikai elemeknek fontos szerep jut.

NOVÁK ERVIN KÁROLY

A mikróbák tápanyaghasznosítási adatai gyenge információk: élesztők

Budapest

Még a molekuláris rendszerezés és faj azonosítás korában is további jelentősége van a mikróbák tápanyag hasznosítási mintázatának a biológiai leírásban, a taxonómiai osztályozásban, és az ökológiai jellemzésben. Az adatok egyszerű „-” és „+” jeles rögzítése (és változatai: gyenge, lassú, stb.) hiányos és/vagy elégtelen (pozitív esetben), mivel nem ad semmi információt a mechanizmusról, a valódi háttérrel, azaz a pozitív reakcióhoz vezető biokémiai folyamatokról. A különböző élesztőfajok ui. a filogenezis során egynél több útvonal-ra tettek szert bizonyos szénhidrátok hasznosításához, különösen a szacharóz és/maltóz esetében. Ez az oka, hogy két (vagy több) törzs azonos M + (vagy S +) eredménye nem tekinthető azonos típusú válasznak. Ennek a taxonómiailag nagyon jelentős problémának a megvilágítása érdekében (elégtelen diagnosztikai adatokkal a fajok taxonómiai leírása érvénytelené válik) 43 élesztő faj szacharóz és maltóz hasznosítási folyamatait tanulmányoztuk (ld. összefoglaló ref. in N.E.K. et al. ISSY5 Part II. p. 37-64, Keszthely, Hung. 1977). Vizsgált fajok: 1.*Bret. cus.anus*, 2.*Bul. tsu.*, 3.*C. alb.*, 4.*benhamiae*, 5.*beverwijkiae*, 6.*brum.*, 7.*clau.*, 8.*clo.*, 9.*grubyi*, 10.*maced.*, 11. *malt.*, 12.*melib.*, 13.*oreg.*, 14.*pseudot.*, 15. *requinnyi*, 16.*sol.*, 17.*stellat.*, 18.*trop.*, 19.*uti.*, 20.*Deb. vanr.*, 21.*vini*, 22.*Hans. beij.*, 23. *Kluyv. dobz.*, 24.*droso.*, 25.*lod.*, 26.*marx.*, 27. *phas.*, 28. *Metsch. pul.*, 29.*Nad. slo.*, 30.*Pich. wick.*, 31.*Rh. muc.*, 32. *sloffiae*, 33.*zsoltii*, 34.*Sacch. carls.*, 35. *cer.*, 35.*kluy.*, 37.*past.*, 38.*pret.*, 39.*Schiz. oct.*, 40. *Spor. sing.*, 41.*Schw. all.*, 42.*Tor. westerdijkiae*, 43.*Win. rob.* (index invalid nevet jelöl). A részletes biokémiai vizsgálat sorozat alapján maltóz esetében 5, míg szacharóznál 4 eltérő (különböző) útvonalat találtunk, mindegyiket különálló specifikus (kötés- és bontás típus, lokalizáció, aceton érzékenység) oligoszacharidáz enzimmal. MALTÁZOK: M-1. és 2.: (rezisztens és érzékeny endomaltáz, M-3.: periplazmás maltohidroláz, M-4. és 5. hidrolitos és glükózil átvivő exomaltáz.; SZACHARÁZOK: S-1. és 2.: rezisztens és érzékeny α -glükozido)-endoszukráz, S-3.: periplazmás (α -glükozido)-szukráz, S-4.: (extracell. reziszt.) β -h-fruktozidáz = invertáz (β -exoszukráz). HORDOZÓ FAJOK: [M-1.]: 3., 4. 6., 9., 16-18., 28., 29., 31., 38.; [M-2.]: 2., 20., 21., 23., 30., 40., 42.; [M-3.]: 11., 34.; M-4.: 39., 43.; M-5.: 7., 13.; S-1.: 2., 3., 4., 9., 13., 15., 16., 18., 21., 30., 33., 40.; S-2.: 6., 7., 28.; S-3.: 8., 11., 43.; S-4.: 1?, 5., 10., 12., 14., 19., 20., 22., 23-27., 31., 32?, 34-38., 41., 42?. Ezért ennek az általános taxonómiai következtetésnek a megoldására az adatokat újjal kell kiegészíteni a hasznosítás részletes biokémiai mechanizmusáról. Egy lehetséges módszert már közöltek (ld.

NE.K.: Acta microbiol. Hung. 8 1 [1961]). Javaslatot kell tenni a Taxonomiai Bizottságnál.
OLÁH JUDIT¹, MISKEI MÁRTON¹, DOMBRÁDI VIKTOR², PÓCSI ISTVÁN¹

Az *Aspergillus nidulans* protein foszfatáz z (ppz) fehérjét kódoló gén klónozása és szekvenálása

¹DE TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék; ²OEC Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen

A fehérje foszforiláció és defoszforiláció olyan ellenőrző mechanizmusok, melyek szabályozzák az eukarióta organizmusok sejtszinten zajló folyamatait. A protein kinázok az ATP terminális foszfátját áthelyezik a fehérjék Ser, Thr és Tyr oldalláncaira, míg a fehérje foszfatázok hidrolitikus reakcióban eltávolítják ezt a foszfát csoportot. Ez a két fajta enzim együttesen határozza meg a célfehérje foszforiláltságát és biokémiai sajátosságait.

Manapság a foszfoprotein foszfatáz (PPP) alcsalád számos új tagját fedezték fel molekuláris genetikai módszerekkel. Ezek defoszforilálják a foszfoproteinek Ser/Thr oldalláncait és szintén fontos élettani szerepük van, de sokkal kevésbé gyakoriak, mint a család úgynevezett klasszikus tagjai és kevésbé detektálhatók hagyományos biokémiai módszerekkel.

A protein foszfatáz Z (PPZ) egy új típusú PPP enzim. Az első *ppz* gént *S. cerevisiae*-ben fedezték fel. Az *S. cerevisiae* 2 *ppz* gént (*ppz1* és *ppz2*) tartalmaz, melyeknek átfedő funkcióik vannak. Genetikai vizsgálatok igazolták, hogy ennek a két génnek fontos szerepe van az ozmotikus stabilitás, sejtintegritás és sejtméret szabályozásában. A *ppz* mutáns élesztő sejtek érzékenyek a koffeinre, de jól tolerálják a magas Li⁺ koncentrációt.

A PPZ gátolja a K⁺ influxot és a Na⁺ effluxot. Ha a PPZ aktivitás károsodott, a K⁺ ionok bejutnak a sejtbe, és megnövekszik az intracelluláris ozmotikus nyomás. Ahhoz, hogy elektrokémiai egyensúly jöjjön létre, H⁺ ionok áramolnak ki, így megnövekszik a pH a sejt belsejében. Az alkalikus sokknak különböző hatásai vannak, például modulálják a génexpressziót, a sejtciklus szabályozását és a fehérje szintézist.

A DNS és fehérje adatbázisok kutatása rámutatott arra, hogy a PPZ jelen van 16 különböző gombafajban, de nem található meg prokariótákban, protozoonokban, növényekben és állatokban. Így a PPZ egy gombaspecifikus fehérje foszfatáz, mely számos alapvető fiziológiai folyamatban játszik szerepet. Mivel a PPZ csak a gombákban fordul elő, ezért ezen gének stratégiaileg fontos targetjei lehetnek a különféle gombaellenes szereknek.

Kutatásainkat *Aspergillus nidulans* fonalas gombával végeztük, mivel ennek genomja 80%-ban homológ az opportunistá humán patogén *A. fumigatus* gombáéval, és mint modellszervezet könnyen kezelhető.

Első lépésként a lehetséges *ppz* gén szekvenciát azonosítottuk az *A. nidulans* genomi adatbázisban homológia kutatással, felhasználva minden elérhető *ppz* szekvenciát. Csak egyetlen ORF mutatott nagyfokú hasonlóságot az ismert szekvenciákkal. Egy 2700 bp-nyi genomi DNS szakaszt, mely tartalmazta a teljes hosszúságú *ppz* gént beleértve a gén promoter régióját, PCR reakcióval amplifikáltunk, majd ligáltuk pGEM-T Easy vektorba. Klónozást követően a DNS szakaszt 12 olyan specifikus primer segítségével szekvenáltuk meg, melyek révén minden bázis legalább 3-szor lett leolvasva. Nagy valószínűséggel a gén két intront tartalmaz és egy olyan 512 aminosavból álló fehérjét kódol, mely szignifikánsan homológ a *N. crassa* PPZ fehérjével.

OLDAL BÁLINT^{1,2}, BÍRÓ BORBÁLA², BAYOUMI HOSAM E.A.F.¹, KECSKÉS MIHÁLY¹

Rhizoszférából származó oltóanyag törzsek öko-fiziológiai szelekciója homoktalajokra

¹SzIE Mezőgazdasági- Környezeti Mikrobiológiai és Talajbiotechnológiai Ph.D. Program, Gödöllő; ²MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézet, Budapest

A növények tápanyag-ellátottsága és a termésbiztonság fokozása érdekében különösen homoktalajokon juthat szerep azoknak a rhizoszférában élő hasznos mikroszervezeteknek, amelyek növekedést szabályozó (PGR), illetve serkentő (PGPR) tulajdonsággal rendelkeznek. A növényoltás során ezek a mikroszervezetek képesek a talajeredetű patogén gombák távoltartására, vagy hormonhatású anyagcseretermékeikkel közvetlenül is segíthetik a növények fejlődését. A rhizoszférában élő baktériumok előfordulásának tanulmányozása során 126 izolátumot nyertünk a Westsik Vilmos által 1929-ben, Nyíregyházán indított vetésgörög-tartamkísérlet rozs, bükköny és csillagfürt növényeinek gyökérrendszeréből ill. talajából. Fenotípusos jellegeik alapján 60 reprezentatív, SDS-PAGE tipizálással 47 individuális törzset különítettünk el. Ezek közül BIOLOG és 16S rDNS módszerrel 26 törzs

fluorescens-putida típusú *Pseudomonas* baktériumnak, 10 pedig *Flavobacterium*-nak bizonyult, néhány *Bacillus* és *Micrococcus* reprezentáns mellett. In vitro jellemeztük az azonosított törzsek legfontosabb öko-fiziológiai tulajdonságait, így pl. hő-, pH-, só- vagy nehézfém-tűrő képességét is. Az auxin és gibberellin-szerű, növényi hormonhatású anyagok jelenlétét reteklevél-tesztrel mutattuk ki. Ellenőriztük a *Pseudomonas* törzsek sziderofor-termelő és antagonista képességét, illetve a két tulajdonság közötti, módszertől függő összefüggéseket is. A rhizoszférából származó törzsek e tulajdonságait a Felső-Tisza árterületéről származó, hasonló módszerekkel jellemzett törzsekkel hasonlítottuk össze, összefüggéseket keresve a törzseredet és bizonyos tulajdonságok megjelenése között [1, 2]. A hatékony mikrobiális oltóanyagok előállítására érdekében a környezeti tényezőknek legjobban ellenálló 6 baktérium törzset vontunk be további vizsgálatokba, ahol a növényi növekedésserkentő hatást axénikus kultúrában, valamint tenyészedényes kísérletekkel is ellenőriztük rozs, bükköny és csillagfürt tesztnövényekkel. A törzsek kolonizációs képességét epifluoreszcens mikroszkóp segítségével állapítottuk meg. Az eredmények alapján kiválasztottuk a hatékony törzseket, illetve törzskombinációkat. Munkánk során alapvető eredményeket szolgáltatunk a Westsik-vetéscserjék, rozs, bükköny és csillagfürt növényeinek rhizoszférájában vagy rhizoplánjában előforduló PGR vagy PGPR tulajdonságú asszociatív és szabadon élő mikroorganizmusairól. Jellemeztük a növényoltások sikerességében leginkább szerepet játszó öko-fiziológiai tulajdonságaikat. Növényoltásra alkalmas törzsgyűjteményt hoztunk létre, melyek hatását léptéknövelő módon a mikrokozmosz kísérletekig ellenőriztük. Ennek során összefüggést találtunk a törzsek vagy törzskombinációk kolonizációs, illetve sziderofor-termelő képessége és eredményessége között, ami a szabadföldi körülmények között is hatékony alkalmazásokat ígér. A kutatások a SZIE Környezettudományi Doktori Iskolája, az OTKA és az NKFP programok támogatásával valósultak meg. 1. Jevcsák I. et al.: *Agrokémia és Talajtan*. 51: 1–2, pp 107–114. (2002). 2. Oldal B. et al.: *Biokémia*. 26: 3, pp. 57–63. (2002).

PAIL, MANUELA

Novel aspects of pentose metabolism in filamentous fungi

University of Technology Section of Molecular Biology, Vienna, Austria

The three major organic components of land-plant biomass are cellulose, lignin and hemicellulose. Whereas cellulose is a linear homopolymer of D-glucose units, the hemicellulose is composed of linear and branched heteropolymers of different aldoses. The most abundant form is arabinoxylan consisting of the pentoses L-arabinose and D-xylose.

Enzymological investigations showed that - in contrast to bacteria - pentose metabolism in fungi occurs by a reduction of the pentose to the corresponding pentitol, its subsequent oxidation to a pentulose, and its phosphorylation to enter the pentose phosphate pathway. While the genes of the bacterial pathways have been known for decades, little is known about the molecular genetics of the fungal pathway. Here I will report results from my recent work on the cloning and functional analysis of the genes involved in this pathway in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*), and will also report on the properties of the encoded proteins. Finally, I will provide evidence that the reductive pathway is also capable of catabolizing D-galactose and L-sorbose.

PÁL-FÁM FERENC

Emberi települések hatása a xilofág nagygombák elterjedésére

KE ÁTK Növénytan és Növénytermesztéstan Tanszék, Kaposvár

Az emberi települések, mint élőhelyek új kiugrási, elterjedési lehetőséget biztosítanak a nagygombák, köztük a xilofág szaprotrófok és paraziták számára. Az antropogén, bolygatott, szennyezett környezet és az ide beültetett, sokszor idegenhonos fák miatt napjainkban speciális nagygombaösszetétel jellemzi ezen területeket. Egyes xilofág fajok gazdapreferenciája jelentősen megváltozott az új szubsztrátumokkal való találkozás következtében, így több, természetes élőhelyén ritka faj fennmaradását vagy elterjedését biztosíthatják az emberi települések új környezeti feltételei. 1995-ben kezdett vizsgálataim eredményeképpen összesen 172 nagygombafaj előfordulását dokumentáltam ilyen élőhelyekről. Ezen fajok közül 36 xilofág szaprotróf és 33 parazita. Közülük hét fajt tart ritkának

természetes élőhelyein a szakirodalom. A *Perenniporia fraxinea* (Bull.:Fr.)Ryvarden, *Polyporus tuberaster* (Pers.:Fr.)Fr., *Lentinus lepideus* (Fr.:Fr.)Fr. és *Inonotus hispidus* (Bull.:Fr.)Karst. új gazdanövényen, a *Flammulina fennae* Bas, *Psathyrella melanthina* (Fr.)K.v.Wav. ss. K.& R. és *Meripilus giganteus* (Pers.:Fr.)Karst. az eredeti gazdán termett. Egyes, természetes élőhelyeiken nem ritka fajok, mint *Flammulina velutipes* (Curt.:Fr.)Karst. és *Volvariella bombycina* (Schaeff.:Fr.)Sing. nagyszámú adata arra enged következtetni, hogy ezek a fajok már tipikus „városi” fajnak tekinthetők. Összefoglalásként, az emberi települések, mint speciális termőhelyek jelentősen növelhetik egyes xilofág nagygombafajok, köztük több ritkának ismert faj elterjedését, így ezen élőhelyek kutatása különös figyelmet érdemel.

PAPP TAMÁS, TAKÓ MIKLÓS, GALGÓCZY LÁSZLÓ, VÁGVÖLGYI CSABA

***Rhizomucor miehei* β-glükozidáz gén izolálása és részleges szekvenciaelemzése**

SZTE TTK Mikrobiológiai Tanszék, Szeged

A termofil *Rhizomucor* nemzetség a Zygomycetes osztály egyik biotechnológiai szempontból legjelentősebb csoportja. Ezek a gombák jól ismertek, mint különböző ipari enzimek (pl. lipázok, proteázok) termelői.

Egy kutatási program részeként számos *R. miehei* és *R. pusillus* izolátum β-glükozidáz aktivitását teszteltük többféle módszerrel és szubsztráttal. Egyes *R. miehei* törzsek esetében erős aktivitást lehetett detektálni. A *R. miehei* NRRL 5901 törzsének genomi DNS mintáiból, ismert gomba β-glükozidáz gén szekvenciák összehasonlítása alapján tervezett degenerált primerek felhasználásával, polimeráz láncreakció segítségével, sikerült felszaporítani egy 810 bp méretű DNS szakaszt. Az amplikont elektroforetikus elválasztást követően izoláltuk, plazmidba klónoztuk és meghatároztuk a szekvenciáját. A fragment a glükozilhidrolázok 3. családjába sorolható β-glükozidázok C-terminális doménjével mutatott homológiát, így ez az első ismert járomspórás gombából származó β-glükozidáz szekvencia. A fragment két intront tartalmaz, maga a kódoló szakasz 660 nukleotidból áll. A kódoló szakasz filogenetikai elemzése alapján jelentősen eltér az aszkuszos és bazídiumos gombák eddig ismert β-glükozidáz géneitől és a *Pyromyces* (Chytridiomycota) extracelluláris β-glükozidázával mutatja a legnagyobb hasonlóságot. Izoenzim és egyéb enzimátikus vizsgálatokat is végeztünk a glükozidáz aktivitás jellemzése érdekében. További vizsgálataink során a teljes gén és a gént határoló régiók izolálását és elemzését tervezzük.

A kutatást az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA F046658 és T037471) támogatja.

PÁSZTI JUDIT¹, NÓGRÁDY NOÉMI¹, KOSTYÁK ÁGNES², VERESS ZOLTÁN², LANCZ ZSUZSA², DAMJANOVA IVELINA¹, KRISZTALOVICS KATALIN³

Az élelmiszerek fertőzést közvetítő szerepének elemzése: *Salmonella spp.* és *Campylobacter spp.* izolátumok molekuláris epidemiológiai vizsgálata

¹Johan Béla OEK Fágtípzálási és Molekuláris Epidemiológiai Osztály, ²Országos Élelmiszervizsgáló Intézet, ³Johan Béla OEK Járványügyi Osztály, Budapest

Az élelmiszerek fertőzést közvetítő szerepének komplex vizsgálata napjainkban – az UNIO-s csatlakozást követően - különös jelentőséget kapott. Magyarországon a humán bakteriális ételfertőzésekért leggyakrabban *Salmonella spp.* által szennyezett élelmiszer (és a nem megfelelő konyhatechnológia) tehető felelőssé. A salmonellosis a leggyakoribb enterális bakteriális fertőző megbetegedés volt a 90-es évek végéig. A bejelentett megbetegedések 1996 óta csökkenő tendenciát mutatnak. Emellett a campylobacteriosis megbetegedések száma a 90-es évek óta folyamatosan magas szinten áll, jelenleg a bejelentett humán esetek száma megközelíti a bejelentett salmonellosisok számát.

Az epidemiológiai összefüggések tisztázásához (közösségi, területi stb. járványok, sporadikusnak látszó esetek közötti kapcsolatok) elengedhetetlen a fenti kórokozók komplex összehasonlító vizsgálata, melynek eredményességét nagyban elősegíti, ha az élelmiszer-lánc (állati, élelmiszer eredetű, humán) reprezentatív mintái kerülnek összehasonlításra.

Osztályunkon a hagyományos fenotípusos tulajdonságok (antibiotikum érzékenység, fágtípus) mellett –

nemzetközi gyakorlatban is alkalmazott - korszerű molekuláris tipizálási módszerekkel vizsgáljuk a Magyarországon különböző forrásokból (állati, élelmiszer, humán) izolált leggyakoribb *Salmonella spp.* (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis* stb.) és *Campylobacter spp.* törzseket. Az alkalmazott módszerek: plazmid profil analízis, PCR segítségével virulencia gének kimutatása, antibiotikum rezisztencia gének vizsgálata, integron kimutatás, integron tipizálás és makrorestrikciós kromoszóma analízis (PFGE).

Egy 2001-ben lezajlott *S. Typhimurium* által szennyezett élelmiszer okozta ételfertőzés kapcsán mutatjuk be azokat a molekuláris tipizálási eljárásokat és eredményeket, melyekkel a fertőzött terjesztő és a megbetegedések közötti összefüggés tisztázásra került.

A feno-és genotípus meghatározásának eredményei általában azt mutatták, hogy a különböző forrásból származó *Salmonella spp.* és *Campylobacter spp.* törzsek molekuláris tipizálása és az adatok elemzése alkalmas részben a fertőzött terjesztő (élelmiszer) megbízható azonosítására, részben a Magyarországon legelterjedtebb klónok regisztrálására, genetikai rokonságának meghatározására. Ennek jelentősége a függetlennek látszó *Salmonella spp.* okozta fertőzések (egy ötödében járványos, négy ötödében látszólag sporadikus formában jelentkeznek), közötti kapcsolatok feltárása, illetve *Campylobacter spp.* esetében a kórokozó magyarországi terjedésének jobb megismerése. A hazai izolátumok komplex jellemzésének köszönhetően adataink nemzetközi együttműködés és adatbázisok (SALMGENE, ENTERNET, PULSENET) keretében összehasonlíthatóvá válnak a külföldön izolált törzsekkel, mely jelentősen hozzájárul az epidemiológiai tevékenység korszerűsítéséhez.

PÁSZTOR MÓNIKA, OLÁH LÁSZLÓNÉ, VENTILLA JUDIT

A *Clostridium difficile* toxinkimutatási módszerek összehasonlító vizsgálata

Fővárosi Szent László Kórház Mikrobiológiai Laboratórium, Budapest

A *Clostridium difficile* toxin asszociálta colitis mikrobiológiai diagnosztikája a baktérium által termelt toxin(ok) székletből vagy baktérium izolátumból történő kimutatásán alapszik. A *C. difficile* két toxint termel, az A és B toxint. Irodalmi adatok azt mutatják, hogy az esetek 3-5%-ában csak a B toxin mutatható ki. Számos – enzimimmunoassay-en (EIA), latex agglutinációval vagy immunokromatográfiás (IC) módszeren alapuló – toxin kimutatási tesztet forgalmaznak a gyártók. Ezek egy része az A, míg mások az A és B toxint mutatják ki 1-2 órán belül. A mikrobiológiai diagnosztikában „gold standardnak” tartott módszer a B toxin kimutatása sejt kultúrán székletből vagy baktérium izolátumból (citotoxikus assay). Ez a módszer azonban minimum 2 napot vesz igénybe. Hasonlóan számos hazai laboratóriumhoz a Főv. Szent László Kórház Mikrobiológiai Laboratóriumában a rutin vizsgálat az aktuálisan kapható, A toxint kimutató gyári kittel történik. Klinikusaink hívták fel figyelmünket arra, hogy az egyik általunk használt teszt eredményei nem korrelálnak a klinikai képpel, ezért elvégeztük az általunk használt gyári tesztek összehasonlító vizsgálatát Vero sejt vonalon végzett citotoxikus assay-vel. A citotoxikus hatást neutralizációval konfirmáltuk (TechLab, USA). A *C. difficile* toxin kimutatására érkezett székletmintákat 328 esetben párhuzamosan vizsgáltuk a *C. difficile* toxin A II teszttel (enzim-linked fluorescent assay, ELFA)(VIDAS, Franciaország) és a citotoxikus assay-vel. Az eredményekben egyezést az esetek 95,73%-ában találtunk. Az irodalmi adatokkal egyezően a citotoxikus assay 2,74%-kal több esetben lett pozitív, míg az esetek 1,53%-ában csak A toxint tudtuk kimutatni az ELFA teszttel. A Toxin-A-Check-1 immunkromatográfiás tesztet (VEDALAB, Franciaország) 234 esetben vizsgáltuk párhuzamosan a citotoxikus teszttel. Egyezést 82,90%-ban, csak citotoxikus hatást 11,97%-ban, csak A toxin pozitivitást 5,13%-ban találtunk. A citotoxikus tesztet „gold standard” módszernek tekintve, a VIDAS *C. difficile* toxin A II. érzékenysége 77,5%, fajlagossága 98,34%, a VEDALAB Toxin-A-Check-1 érzékenysége 57,57% fajlagossága 94,23% volt vizsgálati anyagunkban. A Magyarországon kereskedelmi forgalomban levő VIDAS *C. difficile* toxin A II tesztet megfelelő módszernek, a VEDALAB által gyártott immunkromatográfiás *C. difficile* A toxint kimutató tesztet alkalmatlannak találtuk a rutin mikrobiológiai diagnosztikában, elsősorban annak igen alacsony érzékenysége miatt. Eredményeink egyeznek a kezelőorvosok klinikai tapasztalatával is.

PELES FERENC ÁRPÁD, IGLÓI ATTILA, KERESZTÚRI PÉTER, SZABÓ ANDRÁS

A nyers tej mikrobiológiai minőségének az alakulása Hajdú-Bihar megye eltérő méretű gazdaságaiban

DE ATC Mezőgazdasági Mikrobiológiai Tanszék, Debrecen

Vizsgálataink célja az volt, hogy bemutassuk a nyers tej mikrobiológiai minőségének az alakulását. Ennek az ismerete azért nagyon fontos, mert miután Magyarország csatlakozott az Európai Unióhoz, a tejtermelő gazdaságok közül, csak annak lehet biztosítva a jövedelme, illetve a megélhetése, aki extra minőségű tejet tud termelni.

A téma keretében vizsgáltuk a nyers tej mikrobiológiai minőségének (összcsiraszám, szomatikus sejtszám) az alakulását 2000 és 2002 között, Hajdú-Bihar megye különböző méretű (kis, közepes, nagy) gazdaságaiban.

Az adatok kiértékelése során azt tapasztaltuk, hogy a kiválasztott öt **nagygazdaság** által termelt tej éves átlagos *összcsiraszáma* (a 2000. évi közel 60 ezer db/cm³-ről, 2002-re 40 ezer db/cm³ alá) és az éves átlagos *szomatikus sejtszáma* is csökkent (290 ezer db/cm³-ről, 2002-re 255 ezer db/cm³-re) a gazdaságok átlagában. Ezzel párhuzamosan viszont nőtt az extra minőségi osztályba tartozó tejek aránya (93%-ról 98%-ra). Ezek a jó eredmények a rendszeres tőgyegészségügyi ellenőrzésnek, a beteg állatok és az azok által termelt tej elkülönítésének, a megfelelő tartáskörülmények megteremtésének (megfelelő férőhely, rendszeres almozás és kitrágyázás), a helyesen elvégzett tőgyelőkészítésnek és fejésnek, továbbá a gondos tejkezelésnek (szűrés, hűtés, tárolás) köszönhetőek.

A vizsgált hat **középméretű tejtermelő gazdaság** esetén azt tapasztaltuk, hogy a gazdaságok átlagában elhanyagolható mértékben, de sajnos nőtt a termelt tej átlagos *összcsiraszáma*, az éves átlagos *szomatikus sejtszám* értéke és az extra minőségi osztályba tartozó tejek aránya pedig ingadozott. A közepes méretű tejtermelő gazdaságokban termelt tej mikrobiológiai minőségét, a termelési technológiákkal összevetve, azt állapítottam meg, hogy a változatos tejtermelési körülményeknek megfelelően a termelt tej minősége is változatosan alakult. A gazdaságok között vannak kiváló, de vannak kevésbé jó mikrobiológiai minőségű tejet előállító gazdaságok is.

A vizsgálatba bevont öt **tejgyűjtő csarnok** átlagában, és csarnokonként külön-külön is jelentősen csökkent az átlagos *összcsiraszám* értéke (a 2000. évi több mint 141 ezer db/cm³-ről, 2002-re közel 88 ezer db/cm³-re). A tejgyűjtő csarnok átlagos *szomatikus sejtszáma* körülbelül egy szinten maradt a vizsgált három év során. Az extra minőségi osztályba tartozó tejek aránya a vizsgált három év során növekvő tendenciát mutatott. A jelentős javuló tendencia ellenére, a tejgyűjtő állomásokra szállító kiscsarnokokban még mindig vannak hiányosságok. Többek között nagyobb hangsúlyt kellene helyezni a gyakoribb állategészségügyi ellenőrzésre, valamint meg kellene oldani a fejt tej minél gyorsabb lehűtését, illetve tejgyűjtő csarnokba való szállítását.

Várhatóan tovább fog javulni a termelt nyers tej minősége, a nagy-, a közép-, és a kisméretű tejtermelő gazdaságban egyaránt, amihez véleményünk szerint nagyban hozzá fog járulni a legújabb 1/2003. (I. 8.) FVM-ESZCSM együttes rendelete, ami a nyers tej, a hőkezelt tej és a tejalapú termékek előállításának, forgalomba hozatalának élelmiszer-higiéniái feltételeit határozza meg.

PESTI MIKLÓS, GAZDAG ZOLTÁN, TAKÁCS KRISZTINA, CZAKÓ-VÉR KLÁRA, KOÓSZ ZSUZSA, ANTAL JUDIT, RÁCZ TÍMEA

A krómvegyületek hatásmechanizmusa élesztősejteken

PTE TTK Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék, Pécs

Az iparban széles körben alkalmazott krómvegyületek erősen citotoxikus és genotoxikus hatásúak az élő sejtekre. 3-11 pH-jú vizes oldatban a Cr(VI) kromát anion CrO₄²⁻ vagy CrO₂⁷⁻ és HCrO₄⁻ formában van jelen, szemben a redukált, biológiailag legstabilabb, komplexet képző Cr(III) formával. Elektron paramágneses rezonancia spektroszkóppal (EPR) vizsgálták a Cr(VI) kölcsönhatását a plazmamembránnal *Schizosaccharomyces pombe* króm szenzitív (*chr-51S*) mutáns, króm toleráns (*chr1-66T*) mutáns és a szülői törzs (*6chr+*) esetében. Spin próbaként a membrán jelöléséhez 5-doxil sztearinsavat (5-SASL) és 3-doxil butirilsavat (HO-185) használtak. K₂Cr₂O₇ (225 μM) jelenlétében az 5-SASL-al jelölt szülői és a króm szenzitív törzs membránjának fázis tranzíciós hőmérséklete

kismértékben csökkent. A krómvegyületek hatása még hangsúlyosabb volt a HO-185-el jelölt membránok esetén, ahol azt tapasztalták, hogy a membrán integritásának a megbomlása a víz-lipid határfelületen történik.

Candida albicans ergosterol hiányos *erg-2* és ergosterol termelő 33 *erg*⁺ szülői törzset vizsgálták EPR spektroszkópiával, 5- és 14-SASL spin próbák alkalmazásával. Minimális gátló koncentrációjú - 600 μM - Cr(VI) kezelés hatására szignifikánsan nőtt a spin jelölés rotációs mobilitása és csökkent a struktúra változás hőmérséklete mindkét törzsnél. A többszörösen telítetlen zsírsavakat tartalmazó, sejtmembránnal rendelkező *erg-2* törzs nagyobb Cr(VI) érzékenységet mutatott. Ha ezen törzs sejtmembránját kezelték Cr(VI)-al már 10 perc után megnövekedett a membrán fluiditása. Az előzőleg leírt *C. albicans* törzs esetén a Cr(III), [CrCl₃] *in vivo*, a spin jelölt membrán nagyobb fluiditását eredményezte és ez a hatás még kifejezettebb volt az *erg-2* törzsnél. Az *erg-2* mutánsnál fázis tranzíciós hőmérséklet csökkent 17°C-ról 13°C-ra (ΔAT~4°C). 10 órás 100mM-os Cr(III) kezelés a 260 nm-en abszorbeáló metabolitok vesztéshez vezetett. Ez a vesztés 40%-os volt a 33 *erg*⁺ és 60% az *erg-2* törzsnél. Az impermeábilis Cr(III) ionok által okozott feltáródási folyamat a fő oka a sejtnövekedés gátlásának és a sejthalálnak.

S. pombe auxotróf, heterotallikus (h⁺, h⁻) törzséből (6*chr*⁺ és 9*chr*⁺) indukált mutagenézist alkalmazva Cr(VI)-szenzitív és -toleráns mutánsokat állítottak elő, hogy a továbbiakban genetikai vizsgálatokat végezzenek velük. A mutánsok eltérő mintázatú keresztérzékenységet mutattak Cd²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ és VO₄³⁻ esetén. 30 perces kezelés után a szenzitív mutáns (*chr-51S*) (810 μg g⁻¹ króm szárazanyag tartalom) magasabb, a toleráns mutáns (*chr-66T*) szignifikánsan alacsonyabb bioakkumulációs képességet mutatott, mint a vad típusú törzs. A további genetikai vizsgálatokra 11 mutáns törzset választottak ki. A három kiválasztott Cr(VI)-toleráns törzs (*chr1-66T*, *chr1-14T*, *chr2-04T*) tetrádanalízise azt mutatta, hogy a toleranciát egy mutáció okozta. Random spóra analízissel bizonyították, hogy a mutáció a *chr1-66T* és a *chr1-14T* esetén allélikus volt, míg a *chr2-04T* törzs mutációja nem allélikus a *chr1-66T* törzsével. Transzformációs kísérletekhez rekombinánsokat készítettek, melyek az *ura4D18* szelektív markert hordozták. Két törzset a rekombinánsok közül (*chr1-66T*, *chr2-046T*) arra használták, hogy klónozzák és meghatározzák azokat a géneket, amelyek a Cr(VI) toleráns fenotípust okozzák. A *chr1-66T*, *chr-51S* és a szülői törzset (6*chr*⁺) használták fel a Cr(VI) redukciós folyamatainak vizsgálatára irányuló kísérletekben. A szenzitív mutáns (*chr-51S*) nagyobb mennyiségben akumulálja és redukálja a Cr(V)-öt, mint a szülői törzs. A K₂Cr₂O₇ szubletális dózisban nem indukált adaptív stressz választ, míg a H₂O₂ vagy a menadion előkezelés bizonyítottan megvédte a sejtet a Cr(VI) által okozott sérülésektől. A *chr-51S* törzsnél megközelítőleg fele az intracelluláris glutation (GSH) koncentrációja a 6*chr*⁺ törzshöz képest. Emellett a *chr-5S* törzs glutation diszulfid redukáló képességét szignifikánsan nagyobb glutation reduktáz (GR) és glükóz-6-foszfát dehidrogenáz aktivitással jellemezhetjük. Ezen értékek alapján azt feltételezhetjük, hogy a NADPH/GR rendszer a fő egy elektronos Cr(VI) redukáló a GSH helyett, *in vivo*. Ebben a mutánsban a megnövekedett Cr(V) redukciót magas intracelluláris szuperoxid és peroxid koncentráció kíséri, amely szükséges a hidroxil gyök (·OH) kialakulásához. A *chr-51S*, Cr(VI) szenzitív fenotípusú törzs csökkent intracelluláris GSH szintje arra enged következtetni, hogy a GSH hatékonyan lép fel a kromáttal szemben, mint ·OH gyökfogó. A stabil Cr(VI) toleranciáért felelős génmutációt hordozó *chr1-66T S. pombe* törzs a kromát aniont (CrO₄⁻) szignifikánsan lassabban redukálja, mint a szülői törzs (6*chr*⁺). A mutáns *chr1-66T* törzs bizonyítottan érzékenyebb olyan oxidatív stresszorokkal szemben, mint a H₂O₂, menadion, butil-hidroperoxid és Cd²⁺. A Cr(VI) toleranciát és az oxidatív stressz érzékenységet a csökkent specifikus glutation reduktáz aktivitásnak tulajdoníthatjuk. Ezeket a hatásokat a csökkent mitokondriális Mn-SOD aktivitás szintén fokozza.

Saccharomyces cerevisiae-t, mint modell organizmust használva vizsgálták az antioxidánsként működő aszkorbinsav (C-vitamin) előkezelés hatását Cr(VI) által indukált sejtkárosítás esetén. A kísérlet célja az volt, hogy a sejtek aszkorbinsavval való előkezelése megnöveli a sejt toleranciáját a reaktív króm intermedierekkel és a reaktív oxigén gyökökkel szemben, amelyek a Cr(VI) redukciója során keletkeznek. Meghatározták az intracelluláris oxidációs képességet dihidro-2,7-diklorofluoresceint, dihidroetidiumot illetve dihidrorodamin 123-at használva. Az aszkorbinsav előkezelés hatásának szerepét a Cr(VI) toxicitás esetében mitotikus gén konverziós, reverz mutációs, 8-OHdG, hidroxil gyök, szuperoxid anion és Cr(V) méréses kísérletekkel határozták meg. A biomassza króm tartalmát láng atom abszorpciós spektrometriával vizsgálták. Króm jelenléte nélkül az aszkorbinsav hatékonyan megvédte a sejteket a belső – normális sejtműködés során keletkező - reaktív oxigén gyököktől. Az *in vitro* EPR

mérések és a szupercsavart DNS hasításos kísérletek eredményei alapján megállapítható, hogy az aszkorbinsav pro-oxidatív hatása koncentrációfüggő a Cr(VI) redukció során a káros hidroxil gyök és a Cr(V) keletkezése miatt. Bár az *in vivo* kísérletek arra engednek következtetni, hogy a citoszól megnövekedett redukciós kapacitásának az oka a magas króm akkumuláció, a hatékonyabb szuperoxid anion és hidrogén peroxid lekötés és ezzel együtt az aszkorbinsavval előkezelt sejteknél az alacsony citotoxikus és genotoxikus hatás. Az aszkorbinsav, mint redukáló ágens befolyásolja a Cr(VI) toxicitását azáltal, hogy csökkenti a Cr(V) hatását és mint antioxidáns csökkenti az intracelluláris szuperoxid anion és hidrogén peroxid keletkezését s így meggátolja a szabad gyökök keletkezését a Cr(VI) Cr(III) történő redukciója során. Az aszkorbinsavval kezelt sejtek esetében a megnövekedett 8-OhdG és a csökkent redukált glutation szint arra enged következtetni, hogy ezekben a sejtekben egy belső antioxidáns rendszer aktiválódik és ezért nő meg a sejtek toleranciája a Cr-által indukált stressz során. A króm széleskörű ipari alkalmazása és a környezeti szennyeződések miatt az ember ki van téve e fém egészséget veszélyeztető hatásának. A Trolox - az E vitamin vízoldékony szintetikus megfelelőjének- a hatását vizsgálták Cr(VI) által indukált toxicitás során. A kísérletek célja az volt, hogy megmagyarázzák a Trolox által közvetített pro-oxidatív reakciókat és megállapítsák a Trolox és a Cr(VI) kölcsönhatásának mechanizmusait. Az EPR spektrum és a DNS hasításos kísérletek alapján a Cr(VI) redukció során kialakuló Trolox:Cr(VI) arány fontosnak bizonyul. A Trolox szabadgyök generáló képessége fémek jelenlétében - hozzáadott hidrogén peroxid nélkül - kizárható. Trolox jelenlétében lezajló Cr(VI) redukció során nem volt megfigyelhető DNS károsodás a Trolox gyök jelenléte miatt. Relaxált formájú DNS csak akkor alakult ki, ha H₂O₂ adtak a Trolox/Cr(VI) keverékhez. Ezért azt feltételezzük, hogy a Cr-formák redox ciklusa során kialakuló hidroxil gyökök okozzák a kísérletek során megfigyelt ss DNS töréseket. Figyelembe véve tehát a Trolox pro-oxidatív tulajdonságait, azokban az esetekben, ahol a króm által indukált genotoxikus hatás érvényesül, mint bizonyos foglalkozások és környezeti tevékenységek esetén, ott a Trolox klinikai alkalmazása a jövőben előtérbe kerülhet.

PETRÁNYI GÁBOR¹, MOLNÁR ZSUZSA², FALUDI GÁBOR³

Mumpsz szerológiai vizsgálatok tanulságai egy járvány kapcsán

Johan Béla OEK ¹Virologiai Főosztály; ²Járványügyi Osztály; ³Magyar Honvédség Orvostudományi Kutató Intézet, Budapest

A mumpsz akut, járványos vírusbetegség, amelyre elsősorban a fültőmirigyek gyulladása jellemző, de érinthet egyéb mirigyves szerveket (hasnyálmirigy) és az idegrendszert, és enyhe felső légúti betegséget is okozhat. Egyes megjelenési formái – *meningoencephalitis*, *orchitis*, *mastitis* – gyakrabban, olykor 30%-ban fordulnak elő a serdülőkor után. A tünetesoportot ritkán parainfluenza vírusok is ki tudják váltani. Magyarországon 1991. óta kötelező a mumpsz elleni védőoltás élő, attenuált vírussal. A folyamatos és kampányoltások révén az 1985. június 1. óta született gyermekeket immunizálták, az 1987. június 1. óta születettek pedig újraoltásban is részesültek.

1999-2000-ben az OEK Virologiai Főosztálya szeroepidemiológiai szűrést végzett az ÁNTSZ segítségével gyűjtött vérmintákból. A mumpszvírussal szembeni immunitást a magyar lakosságot reprezentáló 7231 egészséges személy vérmintájában vizsgálták. A szűrés eredményei, valamint az 1984-2003 között az OEK Vírusdiagnosztikai Osztályán igazolt akut mumpsz-fertőzések és a bejelentett *parotitis epidemica* esetek számának alakulása alapján elemeztük a védőoltás által előidézett változásokat. A szűrést indirekt immunfluoreszcens módszerrel végezték. A szűrés idején 1 és 2 éves korosztályban a szeropozitív egyének aránya 40 %, az összes ennél idősebb korosztályban 85-95 % volt. Az 1984/85-ben végzett diagnosztikai vizsgálatok bizonyítják, hogy az átvészeltség milyen lassan emelkedett az életkor függvényében. A védőoltások 4-6 évvel korábbra hozták a védettség kialakulását a fiatalokban.

Az 1974. óta kötelezően bejelentendő járványos fültőmirigy-gyulladás megbetegedések Járványügyi Osztály által összesített éves száma 1990-ig 20000 és 55000 között hullámzott. A kilencvenes évek derekán gyorsan csökkent, 2001. óta pedig a bejelentett súlyos betegek száma nem haladta meg a 200-at. A szerológiai módszerekkel igazolt mumpsz fertőzések száma hasonló módon csökkent.

2003. január 21. és március 27. között mumpsz járvány zajlott egy országhatár közeli kisváros középiskolájában, 11 megbetegedett tanuló közül 10 nem részesült védőoltásban. Az iskola 875 tanulójának többsége oltott korosztályba tartozott, közülük csak egy betegedett meg a bizonyíthatóan

egy és a feltételezett második korábbi oltás ellenére. Ennél a személynél mind az IgG, mind az IgM típusú ellenanyagok emelkedését kimutatták, tehát őt a korábbi védőoltás nem immunizálta. A jelenlegi járványügyi helyzetben a mumpsz-védőoltások eddigi gyakorlatnak megfelelő következetes folytatása indokolt és szükséges.

PETROVAY FRUZZSINA¹, HELTAI KRISZTINA², ENDRÉSZ VALÉRIA³, LUDWIG ENDRE⁴, KISS RÓBERT⁵, GÖNCZÖL ÉVA¹, NAGY ISTVÁN⁵

Összefüggés a ballonkatéteres koszorúér-tágítás (PCTA) után bekövetkező restenosis és a *Chlamydia pneumoniae*, illetve Cytomegalovírus ellenanyag-szint emelkedése között

¹Johan Béla OEK; ²MÁV Kórház Kardiológia, Budapest; ³SZTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet, Szeged; ⁴Szt. László Kórház; ⁵Országos Gyógyintézeti Központ, Budapest

Az atherosclerosis (AT) a népesség nagy részét érintő pathológiai folyamat. Az atherosclerotikus szív- és érrendszeri elváltozások eredete multifaktoriális, kialakulásában a klasszikus rizikófaktorok (nem, dohányzás, magas vérnyomás, diabetes, magas koleszterin és triglicerid szint) mellett egyes patogének szerepe is feltételezhető. Az AT kutatásában a kórokozók közül a legnagyobb figyelmet a *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) baktérium és a cytomegalovírus (CMV) kapta. Koszorúér-betegségben szenvedők esetében az érintett coronaria artériákban érszűkületet okozó atheromás plakkokból számos esetben mutattak ki *C. pneumoniae* DNS-t vagy antigént. Kísérletünkben 28 coronaria betegen végrehajtott ballonkatéteres koszorúér-tágítás (PTCA: percutan transluminalis coronaria angioplastica) után megvizsgáltuk, hogy a beavatkozás eredményezheti-e a plakkokban perzisztáló patogének reaktivációját, illetve van-e összefüggés a restenosis, vagyis a korábbi plakk helyén egy új atheromás plakk kialakulása, és a *C. pneumoniae*/CMV reaktiválódása között. A vizsgálatban a coronaria betegektől 3 esetben vettünk vért: a beavatkozás előtt közvetlenül, utána 4 nappal és 2 héttel. A *C. pneumoniae* és CMV ellenanyag-szinteket ELISA módszerrel állapítottuk meg. Kontrollként a szintén látens perzisztáló Epstein-Barr vírus (EBV) és humán herpes simplex vírus (HSV) ellenanyag-szinteket is meghatároztuk. *C. pneumoniae* DNS jelenlétét a perifériás vérben nested PCR módszerrel mutattuk ki. Az EBV és HSV IgG ellenanyag-szintekben nem tapasztaltunk változást. A *C. pneumoniae* IgA és IgG szint az összes beteg közül 3 esetben mutatott növekedést, a CMV IgG szint pedig másik 3 esetben. *C. pneumoniae* DNS-t 4 esetben sikerült detektálni. Restenosis 6 betegben alakult ki, ezek közül 2 betegnél emelkedett a CMV ellenanyag-szint, másik 2 betegnél a *C. pneumoniae* ellenanyag-szint, valamint 2 esetben sikerült *C. pneumoniae* DNS-t detektálni a betegek véréből. A két patogén által okozott változásokat a teljes mintára együttesen vizsgálva, a kis mintaszám ellenére, szignifikáns különbség ($p=0,007$) volt kimutatható a restenosis szenvedett és nem szenvedett betegek között. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a PTCA beavatkozás reaktiválja a krónikus *C. pneumoniae*, illetve CMV fertőzést, ezzel megnövelve a restenosis kialakulásának valószínűségét.

PÓCSI ISTVÁN¹, MISKEI MÁRTON¹, EMRI TAMÁS¹, KARÁNYI ZSOLT², PATRICIA AYOUBI³, ROLF A. PRADE⁴

Az *Aspergillus nidulans* transzkriptom változásai oxidatív stressz hatására – primer és szekunder metabolizmus

¹DE TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék; ²DE OEC 1. sz. Belgyógyászati Klinika, Debrecen; ³Oklahoma State University Department of Biochemistry and Molecular Biology, Oklahoma, USA

Kései exponenciális növekedési fázisú (16 h) *A. nidulans* FGSC26 tenyészeteket mostunk át frissen készített minimál tápközegbe, melybe vagy 1.8 mM diamidot, 75 mM H₂O₂-ot vagy pedig 0.8 mM menadiont adagoltunk, majd ezt követően a tenyészeteket különböző ideig (15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 9 h) inkubáltuk. A micéliumot minden esetben szűrővel szeparáltuk, majd ezekből oxidatív stressz paramétereket határoztunk meg és teljes RNS-t vontunk ki. A diamidos kezelések nyomán csak a sejtek glutation/glutation-diszulfid (GSH/GSSG) redox egyensúlya borult föl anélkül, hogy az intracelluláris szabadgyök koncentrációk megváltoztak volna. A H₂O₂ hatására a peroxid koncentráció növekedett meg a GSH/GSSG arány csökkenése mellett. A menadion mind az intracelluláris peroxid és szuperoxid szinteket, mind a GSH/GSSG egyensúlyt megváltoztatta. cDNS "pool"-okat állítottunk elő, majd ezeket

A. nidulans GeneArray version I DNS chipre (4090 egyedi EST szekvenciát tartalmaznak) hibridizáltuk Genisphere (Hatfield, PA, USA) 3DNA sub micro EX expression array detection kit, egy kétlépéses, poszt-hibridizációs jelzési technika, felhasználásával. A transzkriptomban bekövetkező változásokat intenzitás-függő "block-by-block loess-type" normalizációt követően értékeltük ki. Összességében 2509 gén expressziója mutatott változást legalább egy stressz-generáló ágens hatására. A primer metabolizmus útvonalai közül a citrát- és glioxilát-ciklusok, az ergoszterin bioszintézise valamint a zsírok lebontása represszálódott a légzés és a purin nukleotidok lebontásának az indukciójával egyidejűleg. Azok a metabolikus útvonalak, melyek a különféle környezeti stresszhatásokkal szembeni védekezésben szerepet játszó vegyületek, pl. glutation, foszfatidil-etanolamin, fruktóz-1,6-biszfoszfát, trehalóz, prolin, spermidin, γ -aminovajsav, húgysav bioszintézisét biztosítják mind indukálódtak a reaktív oxigén részecskéket elimináló enzimekkel együtt. Az oxidatív stressz a szterigmatocisztin szintézis számos lépését is befolyásolta. Érdekes módon, a hidroxiaverantin képződéséhez szükséges kezdeti lépések általában represszálódtak, míg az averufint szterigmatocisztinné konvertáló enzimek indukálódtak.

PUSZTAHELYI TÜNDE¹, EMRI TAMÁS¹, MOLNÁR ZSOLT¹, BALLA JÓZSEF², PÓCSI ISTVÁN¹
***Aspergillus nidulans* kitináz gének expressziójának változása szénlimitált öregedő tenyészetekben és oxidatív stressz hatására**

¹DE TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék; ²DE OEC Nefrológiai Tanszék, Debrecen

A gombák autolízise és öregedése során a sokgénés hidrolitikus enzimek korfüggő expressziója a fehérjék eltérő fiziológiai funkcióját jelzi. A gombák autolízisének idején egy genetikailag jól szabályozott, energiaigényes folyamatban a sejtek anyagai felhasználódnak, és ekkor számos új enzim, így a megjelenő kitinázok magas hidrolitikus aktivitásával számolhatunk. Ugyanakkor ezen gének expressziójának transzkripciójának regulációjáról hiányosak az információink.

Aspergillus nidulans FGSC A26 modellszervezet komplex tenyészetében a gomba öregedése során a szénlimitáció mellett a reaktív szabadgyökök halmozódásával és a GSH/GSSG arány csökkenésével kell számolnunk (2), mint stresszhatással. Ilyen körülmények között vizsgáltuk az adatbázisból azonosított három kitináz (*chiA*, *chiB* és *chiC*) gén expressziójának alakulását Q-RT-PCR alkalmazásával.

A ChiA ismert fiziológiai szerepe a növekedésben van (1), ennek megfelelően a gén expressziója az öregedő tenyészetben a szénlimitáció beálltával represszálódott. A gén szintén jelentősen represszálódott menadion, hidrogén-peroxid illetve diamid oxidatív stressz hatására. Hipotézisünk szerint a ROS szinteknek és a GSH/GSSG csökkent arányának jelentős szerepe lehet a növekedési ráta szabályozásában, legalábbis részben, a *chiA* gén represszióján keresztül. A szénlimitációnak nem lehet közvetlen hatása a *chiA* gén expressziójára, ennek kizárását az 5'-upstream génszakaszon a CreA szabályzó fehérje feltételezett kötőhely hiánya tovább erősítette.

A *chiB* gén expressziója a *chiA* génnel ellentétesen erőteljesen indukálódott szénlimitáció hatására, és a gén feltételezett fiziológiai funkciója elsődlegesen az autolízisben volt. A génextpresszió ebben az esetben relatíve érzéketlen volt az oxidatív stresszre és ez biztosíthatta az expresszió fenntartását, amikor a szénlimitált *A. nidulans* tenyészetekben az autolízis és az öregedés előrehaladt. A tápanyaghiány kiváltotta stressz a *chiB* expresszióját a FluG/FlbA/FadA szignálon keresztül – egy heterotrimer G-protein függő, növekedést befolyásoló szignál-transzdukciós útvonalon át befolyásolhatta.

A *chiC* expressziója nem mutatott jelentősebb változást szénlimitált körülmények között, hidrogén-peroxid vagy diamid által okozott oxidatív stressz esetén, ugyanakkor menadion kezelés hatására gyengén represszálódott. Fiziológiai szerepének meghatározása további vizsgálatokat igényel.

Irodalomjegyzék:

(1) Takaya, N., Yamazaki, D., Horiuchi, H., Ohta, A. and Takagi, M. (1998) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 60-65.

(2) Emri, T., Molnár Z., Pusztahelyi, T., Rosen S. and Pócsi I. (2004) *Folia Microbiologica*, 49, 277-284.

PUSZTAHELYI TÜNDE¹, EMRI TAMÁS¹, MOLNÁR ZSOLT¹, BALLA JÓZSEF², PÓCSI ISTVÁN¹
***Aspergillus nidulans* hidrolitikus enzimek génexpressziójának változása szénlimitált öregedő
tenyészetekben és oxidatív stressz hatására**

¹DE TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék; ²OEC Nefrológiai Tanszék, Debrecen

A gombák limitált tápanyag ellátottság esetén genetikailag szabályozott folyamat során hasznosítják saját anyagaikat, ezt a folyamatot autolízisnek nevezzük. Az autolízis során számos hidrolitikus enzim jelenik meg a gombák tápközegében (glükánázok, proteázok, kitinázok) melyek fiziológiai szerepéről és enzimológiai jellegéről sok, ugyanakkor transzkripciós szabályozásáról kevés ismeretünk van. Munkánk során néhány jelentősebb mennyiségben termelődő hidroláz génexpressziójának változását vizsgáltuk szénlimitált öregedő tenyészetekben, illetve oxidatív stressz alkalmazása esetén *Aspergillus nidulans* FGSC A26 vad típusú törzsben Q-RT-PCR felhasználásával.

A szénlimitáció két kitinolitikus enzim, a kitináz B (*chiB*) gén és egy N-acetil-β-D-glükózaminidáz (*nagA*) expresszióját indukálta. A *chiB* és *nagA* mRNS szintek a késői autolitikus fázisig emelkedtek a sejtekben, majd állandó expressziós szintre álltak be. Nagyon hasonló génexpressziós mintázatot mutatott két vizsgált glükánáz gén is, egy kevert típusú endo-1,3(4)-β-glükánáz (*eglA*) és egy endo-β-1,3-glükánáz (*Aspergillus fumigatus* homológ *engl-1*). Két proteáz (*prtA* és *prtB*) génexpressziója szintén kisebb mértékű emelkedéssel válaszolt a szénlimitáció kialakulására. Ugyanakkor a *prtA* expressziós szintje enyhén csökkent a késői autolitikus szakaszban.

A vizsgálatba bevont hidrolázok génjei nem reagáltak érzékenyen az alkalmazott menadion (szuperoxid generáló ágens), hidrogén-peroxid illetve diamid (GSH/GSSG arányt csökkentő ágens) kezelésre. Ez alól a kijelentés alól egyedül a *prtA* gén expressziója volt kivétel, amely jelentős repressziót mutatott mindhárom ágens alkalmazásakor. A PrtA kivételesen jelentős hidroláznak mutatkozik az *A. nidulans* autolízisében. Fiziológiai szerepét elsődlegesen a korai autolitikus szakaszban a szénforrás ellátás biztosításában látjuk. Később a szabadgyök halmozódás, amely jellemző a késői autolitikus és az autolízist követő szakaszra (1), represszálja a gén kifejeződését.

Irodalom:

1. Emri, T., Molnár Z., Pusztahelyi, T., Rosén S. and Pócsi I.. (2004) *Folia Microbiologica*, 49, 277-284.

RÁBAINÉ PONGRÁCZ JOLÁN¹, PEKÁR GYULA²

Microsporidiosis (magyarországi esetismertetés)

ÁNTSZ Hajdú-Bihar Megyei Intézete, Debrecen; ²Országos Onkológiai Intézet, Budapest

A microsporidiumok közül eddig 8 genusban 13 fajt identifikáltak human microsporidiosis okozójaként. A microsporidiumok a *Microspora* törzsbe tartozó kozmopolita, obligát intracelluláris, spóra formájú mikrobák, amelyek immunkompetens és immunhiányos személyeket egyaránt megbetegíthetnek, többféle, aspecifikus tüneteket okozva. Gazdáik méhek, legyek, szúnyogok, szöcskék, halak, rágcsálók, kutyák, nyulak, más prémes állatok, stb. lehetnek. Terjedési módjuk nem jól ismert, lehetséges pl. a spórák bekebelezésével, inhalálással, direkt inokulációval, szexuális transzmisszióval.

Esetünkben egy 29 éves, ép immunrendszerű, korábban egészséges férfi 12-15 naponként ismétlődő, esetenként 20-25 percig tartó, colicas gyomor és hasi fájdalommal jelentkező, hasmenéssel kísért rosszulleteinek okát keresték, amelyekkel egyidejűleg a beteg orra eldugult, látása elsötétült, pulzusa 140-150/ min.-re emelkedett, fejfájás mellett feje és nyaka kivörösödött, miután vérnyomása 80/60 Hgmm-re esett. Hasmenését egy alkalommal kb. 1 óráig tartó eszméletlenség is követte. Az igen sokrétű kivizsgálásra kiterjedő, kitaró oknyomozásnak köszönhetően végül a második parazitológiai széketvizsgálat *Microsporidium* sp. fertőzést tárt fel. Albendazole terápiát követően betegünk tünetei nem jelentkeztek.

A kórtörténet rámutat, hogy ismeretlen etiológiájú betegségek esetén célszerű lehet többek között microsporidiumok előfordulására is gondolni, különösen olyan pácienseknél, mint betegünk, aki 6 hetet trópusi országokban (Equador, Peru) töltött, ahol nyers ételt fogyasztott és forralatlan folyadékot ivott. Ezt szintén alátámaszthatja, hogy az utóbbi években, irodalmi adatok szerint a microsporidiumok státusa a "szokatlan" jelző helyett az "egyik legjelentősebb fertőzést okozók"-ra változott az immunhiányos személyekben.

RAJČÁNI JULIUS, T. MOŠKO, I. REŽUCHOVÁ, J. KOŠKOVSKÝ, V. ĎURMANOVÁ, M. KÚDELOVÁ

Rekombináns herpes simplex vírus 1 d glikoprotein (gd1) - kódoló DNS vakcina készítése

Slovak Academy of Sciences Institute of Virology, Bratislava, Slovakia

Három különböző nagyságú herpes simplex vírus (HSV) 1 gD polypeptidet kódoló rekombináns plazmidot expresszáltattunk *E. coli* JM109 és BHK-21 sejtekben. A Pin Point Xa-1 vektorokból készített plazmidok, amelyek teljes hosszúságú gD 1 polypeptidet illetve csonka gD polypeptidet (313 vagy 234 aminosav) kódoltak, különböző expressziót mutattak a baktériumsejtekbe való transzformációt követően. A legjobb expressziót a gD313 polypeptidnél értük el, amely a vírus envelopjának külső felületén található gD ektodoménjának felel meg. A gD313 plazmiddal transformált *E. coli* sejtek exponenciális módon növekedtek, és megfelelő mennyiségű fúziós fehérjét termeltek. A baktériumokban termelt biotinilált fúziós fehérjét avidin kromatográfiával különítettük el, majd ebből a gD313 polypeptidet Xa-proteáz alkalmazásával hasítottuk le. Mindhárom expresszált gD polypeptid tartalmazta a VII antigén lokuszt, amely fontos szerepet játszik a vírust neutralizáló ellenanyag termelésében. A gD313 polypeptiddel immunizált Balb/c egerek ellenanyag szintje ELISA tesztben elérte a 65,536-os hígítást. Az immunizált egereknél a virulens HSV-1 SC16 letális dózisa (LD₅₀) 1000-szeresére növekedett. A tőlük nyert limfociták blast- transzformációs tesztben pozitív reakciót mutattak nemcsak a gD313 polypeptiddel szemben, hanem az ultracentrifugálással tisztított HSV-1 virionokkal szemben is. A teljes hosszúságú gD1 polypeptidet és a gD313 ektodomént a pcDNA3.1 vektor alapján készített rekombináns plazmidok segítségével BHK-21 sejtekben expresszáltuk. A pcDNA-gD1 plazmiddal való transzfecció folytán a BHK-21 sejtek 40 napig (9 passzázs) termelték a D1 glikoproteint, amit monoklonális ellenanyaggal illetve az általunk immunizált egerek savójával végzett immunfluoreszcenciás vizsgálatokkal mutattunk ki. A pcDNA-gD1 plazmiddal immunizált egerek vizsgálata még folyamatban van.

RÉVÉSZ SÁRA¹, SIPOS RITA¹, LENOCI, JAMES², KENDE ANIKÓ³, RIKKER TAMÁS³, MÁRIALIGETI KÁROLY¹

Mikrokozmosz kísérletek a rövidszénláncú alifás klórozott szénhidrogének bioremediációjának fejlesztésére

¹ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszék; ²Lenoci és Társa Kft.; ³Dr. E. Wessling Kft., Budapest

A triklóretilén (TCE) az egyik legjelentősebb talajvízszennyező vegyület Magyarországon. A kémiai remediáció a TCE esetében rendkívül költséges, ezért egyre több vizsgálat irányul a TCE szennyezett talajvíz biológiai úton történő kármentesítésére.

A szennyezőanyagok biológiai lebontásának lehetséges megoldása a mikrobák anyagcsere-folyamatainak felhasználása in situ kármentesítés céljából. A TCE aerob körülmények között alig bontható, néhány mikroba azonban anaerob körülmények között bontja. Több ilyen anyagcsere-útvonalat is leírtak, a legjelentősebb gyorsasága, hatékonysága miatt a redukzív dehalogenáció. A szakemberek az elmúlt években az állapították meg, hogy nagyon gyakran a redukzív dehalogenáció folyamata vinil-klorid (VC) felhalmozódását eredményezi, mely még toxikusabb a környezetre, mint a TCE. Azt is megállapították, hogy amelyik területeken sikerült a *Dehalococcoides ethenogenes* kimutatni, ott mindig végbement a teljes redukzív deklorináció etilénig és széndioxidig. A biodegradáció serkentésére különböző adalékanyagokat alkalmaznak, melyek a mikroorganizmusokat serkentik, és így gyorsabb lebontást eredményez.

Egy mikrokozmosz kísérletet terveztünk, ahol adalékanyagok (metanolos rétegvíz, melasz, tejsavó) segítségével kívántuk a redukzív deklorináció folyamatát serkenteni. Az analitikai elemzések mellett specifikus primerekkel, kétlépcsős nested PCR segítségével vizsgáltuk a *Dehalococcoides* sp. jelenlétét, ill. denaturáló gradiens géll elektroforézissel (DGGE) megnéztük miként változik a mikrokozmoszok bakteriális közösségének összetétele.

Négy talajvíz mintából indultunk ki, melyekben kimutatható volt a *Dehalococcoides* sp. A KEW 7 jelű talajvíz magas szulfát koncentrációjú, míg a másik három alacsony koncentrációban tartalmazott szulfátot. A JW 18-2 minta 16-20 m mélyről szivattyúzott erősen szennyezett, lassú áramlású talajvíz, a

JEW 49 és a JEW 18 12 m mélyről, eltérő mértékben szennyezett.

A mikrokozmoszokból a 24. és a 54. napon mintát vettünk, mindkét alkalommal vizsgáltuk a talajvíz halogénezett szénhidrogén tartalmát, a szulfát, a klorid mennyiségét, a pH-t. A második mintavétel alkalmával végeztünk *Dehalococcoides* tesztet és DGGE-t. Két mikrokozmoszból a 98. napon is vettünk mintát gőztér és a víz analitikai elemzésére.

A kémiai elemzések alapján az adalékanyagok közül a savó és a melasz serkentette a degradációs folyamatokat, míg a metanolos rétegvíz csak igen kis mértékben hatott a klórozott szénhidrogének lebontására. A magas szulfáttartalmú talajvíz esetében a TCE lebontása VC-ig történt, de nem képződött se etán, se etilén, metán. Ugyanez az alacsony szulfáttartalmú talajvíz esetében megtörtént, a szulfát elfogyása mellett.

A *Dehalococcoides* sp. teszt az 54. napon vett mintából az első PCR után csak a JW 18/2 kút adott pozitív eredményt, viszont a második PCR eredmények minden minta esetében pozitív volt.

A DGGE vizsgálatokból kiderül, hogy a különböző adalékanyagok a talajvíz közösségét megváltoztatják a kiindulási mintákhoz képest. *Dehalococcoides* sp. a DGGE gélből visszanyert és megszekvenált DNS alapján nem volt kimutatható.

RUSVAI ERZSÉBET, SZILÁGYI EMESE, SZOMOR KATALIN, FERENCZI EMŐKE, BROJNÁS JUDIT, BÖRÖCZ KAROLINA, TAKÁCS MÁRIA, MEZEY ILONA

A vérrel terjedő hepatitisz vírusok előfordulási gyakorisága (prevalenciája) a magyar egészségügyi dolgozók között

Johan Béla OEK Virologiai Főosztály, Budapest

Az egészségügyben dolgozók fokozott kockázatnak vannak kitéve a vérrel ill. testváladékokkal terjedő kórokozók szempontjából. Vizsgálatunk célja az egészségügyi dolgozók körében a hepatitisz B és C vírusok (HBV, HCV) által fertőzött, különböző kockázati csoportokba tartozó, egyének arányának meghatározása volt, egyes hazai gyógyintézetekben.

Keresztmetszeti vizsgálat történt összesen 2132 egészségügyi dolgozó szérummintája segítségével. Közöttük 9 HBsAg hordozó és 13 anti-HCV pozitív egyént találtunk.

A 2000-ben végzett seroepidemiológiai vizsgálatok megfelelő korcsoportjainak eredményével összehasonlítva, sem HBsAg hordozás, sem anti-HCV pozitivitás

szempontjából nem volt szignifikáns különbség ellentétben néhány irodalmi adattal. A hepatitis B átvészeltség (azaz anti-HBc-pozitivitás) a korcsoportok szerint összehasonlítva kizárólag az 50 év feletti korcsoportban mutatott szignifikáns különbséget. Az egészségügyi dolgozók átvészeltsége magasabb volt (24,38%), mint az átlag lakosság átvészeltsége (13,47%). Nem találtunk jelentős különbséget a különböző kockázati szintű munkahelyen dolgozó egészségügyi dolgozók között, sem HBV sem HCV fertőzöttség tekintetében.

SÁMI LÁSZLÓ¹, KISS ISTVÁN¹, URSU KRISZTINA², JOHN MCKILLEN³, BELÁK SÁNDOR⁴

A PPV, PRRSV és ADV sertés vírusok szimultán kimutatása multiplex PCR-rel

¹Debreceni Állategészségügyi Intézet, Debrecen; ²Országos Állategészségügyi Intézet, Budapest; ³The Queen's University of Belfast, Belfast, UK; ⁴National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden

A sertésekben légzőszervi és szaporodásbiológiai rendellenességeket okozó három fontos vírus, a sertés parvovírus (PPV), a sertés reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómáját okozó vírus (PRRSV), és az Aujeszky-betegség vírusának egyidejű kimutatására dolgoztunk ki multiplex PCR rendszert. A módszer érzékenységét a target-kópiaszámok meghatározásával jellemeztük. A PRRSV további vizsgálatára a multiplex reakciót az amerikai és európai törzsek megkülönböztetésére szolgáló, külön szubtipizáló PCR-rel egészítettük ki. A hagyományos, gél-alapú reakciót a további költség- és időmegtakarítás céljából Rapid cyclexerre (Idaho Tech.) is optimalizáltuk (a szokásos 50 µl helyett 10 µl-es térfogatban, kvarckapillárisban), mely a továbbiakban új, gyors és költségkímélő diagnosztikai eljárásul szolgálhat az állatorvosi diagnosztikai laboratóriumokban.

A kutatást az EU 5. keretprogramja támogatta (Szerződés szám: QLK2-CT-2000-00486; Honlap: <http://www.multiplex-eu.org/>).

SÁNDOR ENIKŐ¹, BARÁTH ÁGNES²

Tejsavbaktériumok szelektálása gyökérzöltségek fermentációjához

¹BCE Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék; ²KEKI Biológia Osztály, Budapest

Munkánk célja sárgarépa fermentációjához megfelelő tejsavbaktérium törzsek szelektálása volt biztonságos, tartósító- és vegyszermentes új élelmiszer kifejlesztése céljából.

A törzsek kiválasztása során a következő szempontokat vettük figyelembe: a szelektált törzsek legyenek képesek a sárgarépa természetes flórájának gátlására gyors pH csökkentés és szerves savak, illetve hidrogén-peroxid termelése útján. Ezek a tényezők fontosak a fermentált termék romlásának megelőzése, valamint az eltarthatóság növelése szempontjából. Nagy mennyiségű H₂O₂ termelése hátrányos, mert a törzsekre bizonyos koncentráció felett autoinhibíciós hatást fejt ki, illetve erős oxidálószer lévén károsíthatja a sárgarépa rostjait, vitaminjait és enzimeit. Emiatt olyan törzsekre van szükség, amelyek csak kis mennyiségben termelnek H₂O₂-ot. A tejsavas erjedés során a törzseknek le kell bontaniuk, illetve hasznosítaniuk kell a sárgarépa antinutritív és toxikus komponenseit (nitrát és nitrit).

A fermentáció előtt megvizsgáltuk a sárgarépák (*Daucus carota* var.: Kingston, Flakko, Karotan és Bangor) természetes mikroflóráját. Vizsgáltuk a tejsavbaktérium színtenyészetek antimikrobás aktivitását olyan tesztelő mikroorganizmusokkal szemben, amelyek nagy valószínűséggel előfordulnak a sárgarépán (élesztők és romlást okozók). Ezen kívül vizsgáltuk, mely törzsek termelik a H₂O₂-ot alacsony koncentrációban. Az eredmények alapján három bakteriocin-termelő törzset választottunk ki a fermentációhoz: *Lactobacillus plantarum* 2142, *Lb. casei pseudoplantarum* 2750 és a *Lb. curvatus* 2770 jelzésűt. A többi kritérium teljesülését a fermentáció idején és után vizsgáltuk.

A sárgarépákat előkészítés után színtenyészetekkel oltottuk be (~10⁶ cells/g), 25°C-on 3 napig fermentáltuk, majd 6-8 °C-on tároltuk. A fermentáció alatt és után vizsgáltuk a mikrobák szaporodását (MPN módszer, MRS tápleves), a tejsavtermelés okozta pH-csökkenést, a nitrát (Boehringer-Mannheim teszt) és nitrit (Griess and Ilosvay módszer) koncentrációt a friss zöldségben, valamint a fermentált üledékben és a fermentlében. A tejsav és az ecetsav mennyiségét a tárolás végén mértük a léből (Boehringer-Mannheim teszt).

Eredményeink szerint a pH csökkenése a második napig befejeződött, a levek pH-ja 4,1-4,2 alá csökkent. A fermentáció idején a tejsavbaktérium-szám 2-4 nagyságrenddel nőtt. A 2142 törzs növekedett és csökkentette a pH-t a legeredményesebben. A nitrát redukció és a nitrit asszimiláció a törzsnél megfelelő volt, a redukció mértéke függött a sárgarépa fajtájától. A tejsav- és ecetsavtermelés is megfelelt az elvárásoknak. A 2750 törzssel beoltott Kingston sárgarépa esetében azonban valószínűleg a répa tisztítása nem volt megfelelő, ugyanis a starter törzs mellett képes volt elszaporodni valamilyen mikroba, amely anyagcseréjével kompenzálta a 2750 kedvező tevékenységét: a pH magasabb maradt, kevesebb tejsav és ugyanakkor több ecetsav termelődött.

A peroxid-termelés általában nem befolyásolta a termék megjelenését, csak egy esetben történt olyan mértékű elszíntelenedés (2142-vel beoltott Bangor), amely már elfogadhatatlanná teszi a terméket a fogyasztó számára. A 2750 törzs termelte a legkevesebb H₂O₂-t.

SÁNDOR ERZSÉBET¹, BERNHARD SEIBOTH², KARAFFA LEVENTE³, FEKETE ERZSÉBET³, CHRISTIAN P. KUBICEK²

Riporter rendszer létrehozása a *Trichoderma reesei* peptaibol-szintetáz expressziójának analíziséhez

¹DE Növényvédelmi Tanszék, Debrecen; ²TU Wien, Ausztria; ³DE Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék, Debrecen

A növénykórokozók elleni biológiai védekezés a növénytermesztésben vonzó alternatívája a kemikáliák használatának. Számos *T. harzianum* törzset tartalmazó biopeszticidet használnak a biológiai védekezésben, mivel hatékony parazitája sok gazdaságilag fontos növénypatogén gombának. Sajnos a biokontrol törzsek alkalmazásának hatékonyságát nem könnyű megjósolni, ezért egyelőre szerény versenytársai a különböző kemikáliáknak. A mikoparazitizmus folyamatának molekuláris szintű megismerése mindenképpen elősegíti a *Trichoderma* törzsek eredményesebb és megbízhatóbb

felhasználását a biológiai védekezésben.

A mikoparazita *Trichoderma* fajok a fitopatogén gombákat többlépcsős folyamat során pusztítják el, amiben sejtfalbontó enzimek mellett a termelt antibiotikumok - köztük a peptaibolok - is szerepet játszanak. A peptaibolok olyan gombák által termelt lineáris polipeptidok, melyek 7-20 aminosavból állnak, és közös jellemzőjük, hogy (i) viszonylag nagy arányban található bennük egy „abnormális” aminosav, az α -amino izobutánsav, (ii) N-terminális részükön alkil csoport (általában acetyl), (iii) C-terminális részükön amino-alkohol (például fenilalaninol, vagy leucinol) található. A peptaibolok a nem riboszómán szintetizálódó polipeptidok közé tartoznak. *T. virens*-ből a közelmúltban klónoztak egy peptaibol szintáz enzimet kódoló szekvenciát (*tex1*). A *tex1* 62.8 kb hosszúságú, intron nélküli „open reading frame”.

Tervezett munkánk célja megvizsgálni egy könnyen transzformálható, régóta tanulmányozott, peptaibolt termelő mikoparazita *Trichoderma* törzs, a *T. reesei* (*Hypocrea jecorina*) peptaibol termelését befolyásoló tényezőket, és felderíteni a bioszintézis molekuláris szintű szabályozását.

A génexpresszió Northern analízissel történő vizsgálatát az intront nem tartalmazó *tex1* gén szokatlan nagysága miatt (csaknem 63 kb) elvetettük. A további vizsgálatokhoz egy riportterrendszert hoztunk létre, amelyben a peptaibol szintetáz kódoló *tex1* promóter szekvenciája után egy riportergént, nevezetesen az *Aspergillus niger* glükóz oxidáz génjét (*goxA*) ültettünk be (a *Trichoderma* nemzetségbe tartozó vad típusú fajok közös jellemvonása, hogy nem rendelkeznek glükóz oxidáz aktivitással). Első lépésként megkerestük a *T. virens tex1* génjéhez nagyon hasonló, peptaibol szintetáz kódoló szekvenciát a *T. reesei* genomjában. Ezt követően a kódoló résztől 5' irányban található 900 bp-nyi, a promóter régiót tartalmazó szakaszt klónoztunk a pSJ2 plazmidba, a *goxA* elé. A *T. reesei*-t transzformáltuk a *tex1*-promóter:*goxA* fúziót tartalmazó plazmiddal, és megvizsgáltuk a *T. reesei* peptaibol termelését.

SHELZ ZSUZSANNA¹, MOLNÁR JÓZSEF¹, VERES KATALIN², VARGA ERZSÉBET², MÁTHÉ IMRE^{2,3}

A szurokfű (*Origanum vulgare* spp. *hirtum*) illóolajának kémiai és mikrobiológiai vizsgálata

¹SZTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet; ²SZTE GYTK Farmakognóziái Intézet, Szeged; ³MTA Ökológiai és Botanikai Kutató Intézet, Vácrátót

A szurokfű (amely a köznyelvben oregano néven ismert) széleskörben alkalmazott, népszerű fűszernövény, emellett ismert gyógynövény. Nagy mennyiségben használja az élelmiszeripar és megtalálható több gyógyászati készítményben is. Az *Origanum vulgare* L.-hasonlóan a Lamiaceae család számos tagjához-, morfológiailag és illóolaj összetételét tekintve rendkívül heterogén. Az illóolaj kémiai változékonysága befolyással lehet a drog fiziológiás hatására és módosíthatja gasztronómiai értékét.

Munkánk során Magyarországon termesztett *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart négy szelektált vonalának illóolaját vizsgáltuk kémiai összetétel és antimikrobás hatás tekintetében. A kémiai analízis GC illetve GC-MS módszerekkel történt. A négy minta húsz különböző, előzőleg beazonosított összetevője alapján került összehasonlításra. Az említett húsz összetevő a növények illóolajának mintegy 97,1-97,7%-át teszi ki. A négy szelektált törzsben a legmagasabb koncentrációban előforduló komponens a karvakrol, a γ -terpinén és a p-cimén volt. A Lamiaceae család több reprezentásáról, így a szurokfűről is ismert, hogy illóolaja antimikrobás hatással rendelkezik. Vizsgálatainkban a négy vonal illóolajának antimikrobás hatását hasonlítottuk össze Gram-pozitív (*Staphylococcus epidermidis*), Gram-negatív (*Escherichia coli* F'lac K12 LE140, *E. coli* AG100 proton pumpával rendelkező, *E. coli* AG100A proton pumpával nem rendelkező variáns) baktérium és sarjadzó gomba törzseken (*Saccharomyces cerevisiae* 0425 52C, *S. cerevisiae* 0425 δ /1, *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 14053). Az antimikrobás hatást előzetesen agardiffúziós módszerrel tanulmányoztuk, majd a MIC értékeket leveshígítós módszerrel határoztuk meg. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy az egyes olajok antimikrobás hatásában nem mutatkoztak nagy különbségek, az *E. coli* AG100 és AG100A törzsek érzékenysége azonban eltért egymástól (MIC_{AG100}=0,16-0,24 μ l/ml, MIC_{AG100A}=0,08-0,12 μ l/ml). Ezen ismeretek alapján lehetséges, hogy a vizsgált illóolajok antimikrobás hatásának módja proton pumpával összefüggő mechanizmussal valósul meg.

Vizsgálataink az OTKA (Témaszám: T 037891) és a Szegedi Rákkutatásért Alapítvány támogatásával készültek

SCHNEIDER GYÖRGY^{1,2}, ULRICH DOBRINDT¹, HOLGER BRÜGGEMANN³, NAGY GÁBOR², BRITTA JANKE¹, GABRIELE BLUHM-OEHLER¹, GERHARD GOTTSCHALK³, EMŐDY LEVENTE², JÖRG HACKER¹

A patogenitási szigethez kötött K15-tok determináns genetikai szerkezetének analízise, illetve virulenciában betöltött szerepének vizsgálata egy uropatogén *Escherichia coli* törzsben

¹Institut für Molekulare Infektionsbiologie Universität Würzburg, Germany, ²PTE Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet, Pécs; ³Institut für Mikrobiologie und Genetik, Göttingen Genomics Laboratory, Göttingen, Germany

Az 536-os uropatogén *E. coli* törzs le nem írt K15 tokdeterminánsa egy 79.6 kb méretű patogenitási szigethez (PAI) kötötten kódolt. Ezen sziget az ötödik (PAI V₅₃₆) az 536-os törzs kromoszómáján azonosított patogenitási szigetek közül, és teljesen hiányzik az apatogén K-12 *E. coli* törzs (MG1655) kromoszómájából. A *pheV* tRNS gén területébe integrálódott sziget szerkezetét egy *pix* fimbrális géncsoport, egy foszfogllicerát transzportért felelős szakasz, egy autotranszporter determináns, számos hipotetikus ORF és integrázok, illetve IS elemek jelenléte jellemzi. Ezen elemektől disztálisan helyezkedik el az általunk jellemzett genetikai szerkezettel rendelkező 20 kb hosszú K15-ös tokdetermináns, illetve egy hipotetikus általános szekréciós mechanizmusért felelős géncsoport. Funkcionális analízissel (RT-PCR) feltérképeztük ezen géncsoportok aktivitását. Deléciós mutánsok segítségével igazoltuk, hogy ezen kevert genetikai szerkezetet mutató tok determináns valóban felelős a K15 fajlagosságú antigenitás kialakításáért és a tok jelentős szerepet tölt be az urovirulenciában.

SINKÓ ILONA, HANTOS GÁBOR

***Arthrobacter simplex* eredetű sejtmentes 3-ketoszteroid-1-dehidrogenáz enzim kinyerési körülményeinek vizsgálata**

Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Rt., Budapest

A 3-ketoszteroid-1-dehidrogenáz enzimek végzik a szteroidok A gyűrűjének 1-2-es pozíciójába a kettős kötés bevitelét. Az induktív enzim erősen kötődik a sejtreszecskekhez, nehezen szolubilizálható. Koenzimje FAD jellegű, a koenzimet csak irreverzibilisen lehet eltávolítani, ezután az aktivitás már csak mesterséges elektronakceptor hozzáadásával tartható fent.

A sejtfeltárás művelete az enzim aktivitásának megőrzése mellett bonyolult feladat. Kísérleteink során többféle sejtfeltárási mód mellett vizsgáltuk az enzim aktivitásának alakulását. Kipróbáltunk nagynyomású feltárást, ultrahangos, fagyasztás-felolvasztásos módszereket, ezeket alkalmanként még detergens adagolásával is kombináltuk.

Kétféle módon indukált tenyészetekben összehasonlítottuk a sejtfeltárási tapasztalatokat, az enzim inaktiválódásának folyamatát. A 3-ketoszteroid-1-dehidrogenáz mellett egyéb fehérjék felszabadulását is követtük fehérjetartalom mérésekkel (Lowry módszer), ezzel is alátámasztva következtetéseinket.

Abban az esetben, ahol a hidrokortizon mellett egy delta-9-11-progeszteron származékot adtunk a tenyészethez indukció céljából (2. indukció), magasabb enzimaktivitás és sejtsűrűség értékeket mértünk és a különbség a sejtfeltárási kísérletek alatt is megmaradt.

Nagynyomású (800bar/3x) feltárást meglepő módon csak elhanyagolható mértékű sejtroncsolást tapasztaltunk mindkét esetben, viszont a megmaradt aktivitás 13-15%-a a felülúszóban volt mérhető.

Megfigyeltük, hogy a 2. típusú indukció esetén a szteroid nemcsak jobban indukálta, hanem feltehetőleg jobban is stabilizálta az enzimet, amire a centrifugálás után mért eredmények utaltak.

A sejtfal előzetes fellazítására Triton X100-tartalmú detergens-oldatot használtunk, ez önmagában a sejtfalhoz kötött enzim eltávolítását nem eredményezte, de többszörösére növelte az enzim aktivitását a sejtben. Ez arra engedett következtetni, hogy a kezelés hatására a sejtfal átjárhatóbb lett, így a szubsztrátum számára könnyebben hozzáférhetővé vált az enzim. Legeredményesebb módszernek az ultrahangos és a fagyasztás-felolvasztásos módszerek bizonyultak, de az utóbbinál a felolvasztás után az enzim nagy mértékben inaktiválódott.

Ígéretes eredményeket hozhat az ultrahangos kezelések védőközegben történő kipróbálása, valamint lízispufferrel kezelt sejtek nagynyomású feltárása és az üveggyöngyös feltárást hatásának vizsgálata.

SIPOS RITA¹, NIKOLAUSZ MARCELL², PALATINSZKY MÁRTON¹, SZÉKELY ANNA¹, RÉVÉSZ SÁRA¹, MÁRIALIGETI KÁROLY¹

Molekuláris ujjlenyomat módszerek (DGGE, TRFLP) tesztelése különböző univerzális primer párokkal

¹ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszék, Budapest; ²Umweltforschungszentrum, Leipzig, Germany

A multitemplát PCR közösség torzító hatását többen leírták és bizonyították. Az általunk összeállított modell közösségben TRFLP módszerrel detektáltuk, hogy milyen mértékben módosulnak a PCR során az eredeti templát viszonyok. A TRFLP módszerrel detektált csúcsok görbe alatti terület arányaiból következtettünk egy közösségben az adott amplikon relatív abundanciájára. A négy törzsből álló modellközösség vizsgálatai alapján a legjelentősebb aránytorzulások az alkalmazott „univerzális” primerek szelektivitásából adódtak. Míg az EUB-27F primer nem tartalmazott illeszkedési hibát (*primer mismatch*) a modellrendszer tagjainál, az EUB-63F primer rendre kisebb mértékben szaporította fel két *Bacillus* faj 16S rDNS génjét, mivel itt ez a primer 3 illeszkedési hibát is mutatott. Az illeszkedési hiba által okozott aránymódosulás mértékét az annealációs hőmérséklet függvényében is meghatároztuk.

A modellrendszer segítségével nyert tapasztalatokat a továbbiakban különböző környezeti mintákon teszteltük. Mivel az EUB63F primer alulreprezentálta a Gram-pozitív szervezeteket, ennek bizonyítására olyan környezeti mintát választottunk, ahol elméletileg Gram-pozitív dominanciát kellene tapasztalnunk. Termofil komposzt közösség elemzésére az EUB-GC-63F-338R illetve az EUB-GC-968F-1401R primer párokkal a kapott DGGE mintázatokat és szekvencia adatokat vizsgáltuk. A szekvencia adatokból egyértelműen kiderült az EUB-63F primer preferenciális amplifikációja.

Egy mesterséges lúp gyékény rizoszféra és rizoplán közösségét vizsgáltuk továbbá TRFLP módszerrel, EUB-27F és az EUB-63F primereket használva. Ezeknél a mintáknál már nem egyértelmű a primerek szelektivitása. A különböző primerekkel kapott mintázatok azonban különböztek egymástól. Felmerült a kérdés, hogy vajon több különböző módszerrel végzett közösségelemzésekkel párhuzamosan érdemes lenne egy mélyreható vizsgálatot végezni egy kiválasztott módszerrel, és több un. „univerzális” primerrel.

A DGGE ujjlenyomat módszer 3 primer párral történő összehasonlítását egy mesterséges lápról, illetve a telepítés helyéről származó gyékény és nád rizoszféra és rizoplán mintákon vizsgáltuk. Az egyes primer párokkal jelentős felbontásbeli különbségeket tapasztaltunk. A sávmintázatok alapján szerkesztett dendrogramok megbízhatóan tükrözték az egyes mintapárosításokat több primer pár mintázata alapján is. Azonban a 15 minta nagyobb csoportosulása más tényezők mentén mutatkozott. Az EUB-GC-968F-1401R DGGE mintázatoknál a minták alapvetően a mintavételi időpont alapján, míg az EUB-GC-63F-338R DGGE mintázat esetén a főbb csoportok a növények, ezen belül a rizoszféra frakciók, és legutolsón a szezonális alapján csoportosultak.

A konzekvensen egymással csoportosuló minták 16S rDNS alapú hasonlósága megalapozott, azonban messzemenő következtetéseket levonni csak több módszerrel illetve primer párral történő vizsgálat alapján lehetséges.

SISAK CSABA¹, KASKÖTŐ ZOLTÁN², LAKATOS TAMÁS²

Rovarpatogén fonálféreg szimbionta baktériumának tenyésztési vizsgálatai

¹VE Műszaki Kémiai Kutató Intézet, Veszprém; ²Északkelet-Magyarországi Gyümölcsstermesztési Kutatás-Fejlesztési Alapítvány, Újfehértó

A vizsgált baktériumtörzs, a *Photorhabdus* sp. '267' a biológiai növényvédelmi célra alkalmas rovarpatogén fonálféreg szimbionta mikrobái közé tartozik, amely endotoxin termelése révén szerepet játszik a rovarlárva elpusztításában, antibiotikum termelése a rovarhullát védi más mikroorganizmusoktól, ill. primer fázisvariánsa a fonálféreg számára közvetlen táplálékforrást jelent.

A mikroba a 2003-ban Nyíribrony 2/D erdőtagból izolált *Heterorhabditis* sp. '267' jelzésű fonálféreg törzs szimbionta baktériuma. A fonálféreg a cserebogár (*Melolontha melolontha*) pajorjai ellen hatékony, ezért potenciálisan a pajorok elleni biológiai védekezési eljárás fontos eleme lehet. A fonálféregtörzs taxonómiai helyzete nem teljesen tisztázott, a riboszómális RNS-eket kódoló gének közé ékelődő ITS régiók DNS szekvenciája alapján a legközelebb a *Heterorhabditis downesi* nevű,

mérsékeltégóvi fajhoz áll. A szimbionta baktérium valószínűleg a *Photorhabdus temperata* nevű faj, ez a megállapítás azonban még molekuláris biológiai vizsgálatokkal megerősítésre vár.

A szimbionta baktérium tenyésztése rázatott lombikos kísérletekben LB illetve TSY tápoldatban történt. Az élő sejtek számának meghatározását LB szilárd tápaltalaj indikátor lemezen végeztük, amely a primer ill. szekunder fázisvariánsok megkülönböztetésére brómtimolkék (BTK), ill. tetrazonil-klorid (TTC) színindikátort tartalmazott. A kísérletek során vizsgáltuk a hőmérséklet és az oxigénellátási viszonyok hatását a mikroba primer élősejtszámának alakulására, valamint a primer élősejtszám fenntarthatóságára. Megállapítottuk, hogy a sejtek a közepesnél jobban levegőigényesek. A rövid távú (48 h) tenyésztés során a primer sejtek száma a 26-29°C-on adódott legmagasabbnak, de a fenntarthatóság szempontjából a 20-22°C hőmérséklettartomány volt a legkedvezőbb, tekintettel arra, hogy a nematoda szaporításhoz szükséges hosszú időtartamú (500 h) tenyésztés során számítani kell hosszabb-rövidebb részlegesen oxigénhiányos időszakokra.

Mivel a fellépő nyíróerők és az oxigéntranszport együttes hatását tekintve a fermentortípusok közül a nematoda tenyésztésre előnyösnek tartják a mechanikusan kevert hurokreaktorokat [1], egy betétcsővel ellátott INEL BR 97 típusú, 5 dm³-es, laborfermentorban végeztünk tartamkísérleteket. Ezek tapasztalatai megerősítették a fenti megállapításokat, emellett a kívánatos inokulálási sejtszám nagyságára és a tápanyag utánpótlásnál alkalmazandó körülményekre vonatkozóan is fontos információkat kaptunk. A fermentáció 120-190. órája közötti időszakban kapott oxigénszint-változási és primer élősejtszám adatok azt igazolták, hogy sikerült a tápanyag rátáplálás szempontjából mind a megfelelő szubsztrátkoncentrációt, mind az alkalmas adagolási ütemezést megtalálnunk. Az oldott oxigénszint a telítés és 40% között ingadozott, amikor a rátáplálást 22-24 óránként végeztük, oly módon, hogy a fermentlé 30-33%-át cseréltük le friss tápoldattal.

SÓKI JÓZSEF¹, DAVID W. HECHT², FODOR ELEONÓRA¹, NAGY ERZSÉBET¹

***Bacteroides* fajok imipenem és metronidazol rezisztencia géneit aktiváló új inszerciós szekvencia elemek azonosítása**

¹SZTE Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet, Szeged; ²Loyola University Chicago Department of Medicine Microbiology and Immunology, Maywood, USA

Az inszerciós szekvencia (IS) elemek kis méretű (<2,5 kb), rendszerint “önző” DNS szakaszok, amelyek egyetlen protein terméke a transzpozíciójukban részt vevő a transzpozáz enzim. Mobilitásuk hasznos lehet a genom fluiditása, mutabilitása szempontjából, és a közelben lévő gének transzkripcióját is befolyásolhatják. A legjelentősebb endogén anaerob kórokozók és fontos kommenzalista *Bacteroides* fajok szintén a fent említett, bizonyos IS elemek transzkripciót befolyásoló tulajdonságát használják ki a karbapenemek (*cfiA*) és nitroimidazolok (*nimA-G*) elleni rezisztencia gének aktivitásának fokozásában. A számos *Bacteroides* IS elem az IS4 és IS5 IS elem családokba tartozik.

Egy számos országból származó, a laboratóriumunkban folytatott imipenem rezisztens *B. fragilis* törzseket magában foglaló analízis a *cfiA* genektől upstream számos *cfiA* gént aktiváló IS elemet határozott meg (IS613, IS942, IS1169, IS1186, IS1187). Ezeken felül az IS614B és IS614C elemek, amelyek Japánban izolált imipenem rezisztens *B. fragilis* törzsek *cfiA* géneit aktiváló IS614 és IS612 elem hibridjének bizonyultak, és egy teljesen új szekvencia, az IS943, került azonosításra. Ezen új IS elemek G+C molaránya 44-46 %, a *Bacteroides* kromoszómák összetételéhez közeli értéket mutatott, és az IS4 családba tartozott. Az IS614B a nyugati országokban leggyakoribb *cfiA* aktiváló IS elemnek bizonyult, míg Magyarországon 17 *cfiA* pozitív, de imipenem érzékeny *B. fragilis* törzs közül 2 hordozta a ezt az elemet.

Korábban bemutattuk a *nimE* gének Southern blotolósos lokalizációjára irányuló kísérleteinket. A *B. fragilis* 388 törzs *nimE* gént hordozó pBF388c plazmidja (8,3 kb) bővebb jellemzésre került egy metronidazol érzékeny gazdatörzsbe való juttatás után. A *nimE* gént hordozó *EcoRV* restriktions fragment egy szintén új, nem szokványos IS elemet (IS388) is hordozott a rezisztencia géntől upstream. Az IS388 legközelebbi homológjai Gram pozitív baktériumok IS elemei.

A fenti új IS elemek kifelé irányuló promóter struktúrái és a *Bacteroides* IS elemek sokfélesége tárgyalásra kerül.

A fenti munka az OTKA T037475 sz. grant és az European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases kutatási díja (Sóki József) által nyert anyagi támogatást.

SOMOGYVÁRI FERENC, DÓCZI ILONA, NIKODÉM ÉVA, SERLY JUDIT, NAGY ERZSÉBET
Szepszist okozó *Candida* fajok azonosítása valós idejű PCR készülékkel
SZTE Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet, Szeged

A *Candida* fajokat tartják a negyedik leggyakoribb, szepszist okozó patogéneknek. Ezen infekciók mortalitása 50%.

Tenyésztéses eljárásokkal a gombaszepszisek azonosítása nehézkes, emiatt tenyésztés nélküli kimutatási eljárásokat dolgoztak ki, mint a PCR, a galaktomannán kimutatás és a Western blott.

A PCR alapú eljárások közül az rRNS kódoló szakaszok vizsgálata terjedt el, mivel ezek több kópiában vannak jelen, és ez megnöveli a kimutatás biztonságát. Az amplifikált szakaszok további elemzése időigényes, és ez nem mindig felel meg a klinikum elvárásainak.

Jó megoldást jelenthet a valós idejű PCR készülékek használata. Ezek legtöbbször fluoreszcensen jelölt hibridizációs próbákat használnak a kimutatáshoz. Minden egyes vizsgálni kívánt gombafajhoz specifikus próbát terveznek, és ez megnöveli a kimutatás költségeit.

Célunk az volt, hogy kellően specifikus, érzékeny és gyors módszert dolgozzunk ki a szepszist okozó leggyakoribb *Candida* fajok kimutatására.

Első lépésben egy megbízható DNS preparálási metodikát dolgoztunk ki, mellyel mind vérből, mind hemokultúrák palackból -az eddigieknél gyorsabban- tudunk gomba nukleinsavat izolálni.

Az amplifikációt LightCycler (Roche) készülékkel, aspecifikus SybrGreen festék segítségével végeztük el. A *Candida* fajokat az amplikonok „melting-point” (olvadási hőmérséklet) analízisével különítettük el.

A vizsgált 7 faj és a kapott hőmérsékletek: *Candida albicans* (87,1 °C), *C. tropicalis* (84,5 °C), *C. glabrata* (84,9 °C), *C. parapsilosis* (85,4 °C), *C. kefyr* (86,7 °C), *C. inconspicua* (88,0 °C) és *C. krusei* (90,8 °C).

Ez a metodika nem alkalmas a gombafajok általános azonosítására, de a szepszist okozó *Candida* fajok gyorsan és megbízhatóan elkülöníthetőek.

SPENGLER GABRIELLA¹, MOLNÁR ANNAMÁRIA¹, KLAUSZ GERGELY¹, MÁNDI YVETTE¹,
MASAMI KAWASE² LEONARD AMARAL³, MOLNÁR JÓZSEF¹

Trifluoroketon proton pumpa gátló antiplazmid és baktérium mozgást gátló hatása *Escherichia coli* és *Helicobacter pylori* törzseken

¹SZTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet, Szeged; ²Faculty of Pharmaceutical Sciences Josai University Sakado, Saitama, Japan; ³Unit of Mycobacteriology Universidade Nova de Lisboa, Portugal

Az antibiotikumok széles körben történő alkalmazása a bakteriális rezisztencia növekedéséhez vezet, ezért is különösen nagy szükség van új antimikrobiális vegyületek kifejlesztésére.

Korábbi kísérleteinkben egy trifluoroketon származék, az 1-(2-benzoxazolyl)-3,3,3-trifluoro-2-propanon [TF18] hatékony antimikrobiális szernek bizonyult. *E. coli* és *H. pylori* törzsek esetén, valamint antiplazmid vegyületekkel (fenotiazinok, 9-aminoakridin), illetve a Ca⁺⁺-csatorna blokkoló verapamillal kombinálva a plazmidelimináció hatékonyságát is növelte laboratóriumi és klinikai *E. coli* törzseken. Mivel a doxycyclin rezisztens klinikai izolátumoknál a laboratóriumi *E. coli* K12 LE140-es törzshöz képest jóval alacsonyabb eliminációs frekvenciát kaptunk, arra következtetünk, hogy ezen törzseknél valamely permeabilitási barrier (efflux, influx) miatt nem jutott elegendő antiplazmid vegyület a sejtekbe.

Vizsgáltuk továbbá a TF18 baktériummozgásra gyakorolt hatását is clarithromycin érzékeny és rezisztens *H. pylori* izolátumokon, mivel a mozgás fontos virulenciafaktor lehet e mikrobáknál. A TF18 gátolta a flagellum mozgását mindkét *H. pylori* törzsnél. Az úszó, előre felé irányuló baktériummozgás hatékonyabban volt gátolható, mint a bukfencező mozgás. Feltételezzük, hogy a vegyület a transzmembrán proton gradiens megbontásával, és ennek következtében az ATP szintézis csökkentésével gátolja a baktérium mozgását, csökkentve ezzel a kórokozó virulenciáját is.

A trifluoroketonok a korábban már leírt antibakteriális, antifungális és anti-HIV hatásukon kívül kombinációban növelik a plazmideliminációt, valamint gátolják a vizsgált *H. pylori* és *E. coli* törzsek mozgását.

STIPKOVITS LÁSZLÓ, *BÍRÓ JUDIT, ERDEI NOÉMI, SZATHMÁRY ZSUZSANNA
***Mycoplasma bovis* kimutatására alkalmas primerek optimalizálása és alkalmazása**
MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet, Budapest

A szarvasmarhában jelenlegi tudásunk szerint több mint 20 *Mycoplasma*-faj fordul elő. Ezek között a legfontosabb a ragadós tüdőlob kórokozója, a *M. mycoides subsp. mycoides* SC. A többi *Mycoplasma*-faj között a legjelentősebb a *M. bovis*. E faj által előidézett fertőzöttség világszerte előfordul. A szarvasmarha *Mycoplasma bovis* okozta fertőzöttsége hazánkban egyre inkább terjed. Nagyon változékony klinikai tüneteket (tüdő- és ízületgyulladást, szaporodásbiológia problémát, tőgygyulladást) okoz, emiatt jelentős gazdasági veszteséget eredményez. A fertőzöttséget csak nagy nehézséggel és hosszadalmasan lehet diagnosztizálni. A betegség elleni védekezés nehéz, mivel az *M. bovis* törzsek általában lényegesen rezisztensebbek a piacon lévő antibiotikumokkal szemben. Ezen kívül a mintákban előfordulhatnak olyan *Mycoplasma*-fajok, amelyek tenyésztési és biokémiai tulajdonságokban hasonlítanak *M. bovis*-ra. A változó klinikai kép feltételezi az egyes törzsek eltérő szertropizmusát és antigén struktúráját. Ez megnehezíti és meghosszabbítja a fertőzöttség diagnosztizálását. Az Utóbbi években PCR-t is alkalmazni kezdték, azonban nincs kellő adat az irodalomban, milyen a PCR teljesítőképessége ellenőrzött körülmények között.

Emiatt tűztük ki célul különböző, a *M. bovis* kimutatására ajánlott primerek tesztelését, a PCR reakciókondíciójának optimalizálását és mesterséges fertőzési kísérletekből származó minták vizsgálatában való kipróbálását.

A munka során a *Mycoplasma bovis* fertőzöttség kimutatására alkalmas háromféle PCR módszert teszteltünk:

a) A *M. bovis* genom dezoxiribodiprimidin fotoliáz enzimét kódoló *uvrC* génjéhez kapcsolódó MBOUVRC-2L, MBOUVRC-2R primerek segítségével egy 1626 bázispár hosszú DNS szakaszt tudunk amplifikálni.

b) Ugyancsak az *uvrC* génhez kapcsolódó BOVNEST 20-L és BOVNEST 20-R primerekkel 1000 bázispár nagyságú DNS szakaszt lehet amplifikálni.

c) Végül a 16S RNS szekvencia alapján kiválasztott MboF2 (469 nukleotid pozíciójához kötődő) és MboR2 (1156 nukleotid pozíciójához kötődő) primerekkel végeztük a harmadik PCR reakciót.

A reakciók beállítása után természetes körülmények között fertőződött idős tehének és mesterségesen fertőzött 3-12 hetes borjak orrtampon-, ill. vágási tüdőmintáit vizsgáltuk. Összesen 7 kísérletet végeztünk 24-84 állattal kísérletenként.

A preparálás módja nem befolyásolta a PCR eredményeket. A kidolgozott PCR módszer mind a 3 primer párral eredményes volt az *M. bovis* törzsek kimutatására. A próba jól alkalmazható a természetes körülmények között fertőződött vagy mesterségesen fertőzött állatok légútjaiban vagy szerveiben az *M. bovis* kimutatására. Ezek a primerek különböző eredetű törzsek között ampliton méretben különbséget nem eredményeztek. A PCR nagyobb arányban mutatta ki a *M. bovis*-t, mint a tenyésztés. Tenyésztés során más szaprofita mycoplasmák és egyéb baktériumok elszaporodnak. Ez a módszer gyorsabbá és biztonságosabbá teszi a *M. bovis* diagnosztikát figyelembe véve, hogy az *M. bovis* nagyon változatos klinikai és kórbonctani képet idéz elő.

STIPKOVITS LÁSZLÓ¹, BÍRÓ JUDIT¹, ERDEI NOÉMI¹, SZATHMÁRY ZSUZSANNA¹, ULRICH KLEIN²

Mycoplasmák antibiotikum érzékenységének vizsgálata

¹MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet, Budapest

A *Mycoplasma* okozta pneumonia és arthritidis világszerte elterjedt és komoly gazdasági veszteséget okoz. Az antibiotikumok használata a Mycoplasmák elleni védekezés részét képezi és a különböző törzsek érzékenységén alapszik.

A munka célja a különböző sertés eredetű *Mycoplasma* törzsek (*Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae*) valnemulin, tiamulin, tylosin, lincomycin, tilmicosin, klórtetraciklin, doxiciklin illetve valnemulin + doxiciklin és tiamulin + doxiciklin kombinációk elleni érzékenységeinek vizsgálata volt.

Minden fajból tíz törzset izoláltunk sertés tüdőből, és Friis mediumban vagy B mediumban tenyésztettük. A törzseket biokémiai és szerológiai módszerekkel azonosítottuk, majd elvégeztük a törzsek érzékenységének vizsgálatát abban a médiumban, melyben a tenyésztés történt. Minden antibiotikum törzsoldat koncentrációja 128 µg/ml volt, a steril törzsoldatokat –20 °C-on tároltuk.

Az érzékenységi tesztet polisztrén mikroplate-eken végeztük. Az antibiotikum törzsoldatokból 32-0,03 µg/ml koncentrációjú hígításokat készítettünk és ehhez adtuk a különböző *Mycoplasma* törzseket (10^5 CFU/ml), majd 37 °C-on inkubáltuk azokat. A lemezeken naponta vizsgáltuk a színváltozást, amely a *Mycoplasma* törzsek növekedését (antibiotikum adott koncentrációjával szembeni rezisztenciát) jelzi. Az *M. hyopneumoniae* és *M. hiorhinae* törzsek esetében narancs szín, míg az *M. hyosynoviae* törzsek esetében rózsaszín jelenik meg.

A vizsgált *Mycoplasma* törzsek a valnemulin és a tiamulin ellen mutatták a legnagyobb érzékenységet. Az eredmények alapján mind a valnemulin, mind a tiamulin hatékonyabb volt amennyiben doxiciklinnel együtt alkalmaztuk.

SVEICZER ÁKOS¹, CSIKÁSZ-NAGY ATTILA¹, JOHN J. TYSON², NOVÁK BÉLA¹

A hasadó élesztő sejtciklusának matematikai modellje

¹BME Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszék; ²Virginia Technology Department of Biology, Blacksburg, USA

A hasadó élesztőgomba (*Schizosaccharomyces pombe*) egy régóta sikerrel alkalmazott modell- és tesztorganizmus a sejtciklus-kutatásokban. Ez az egysejtű, ősi tömlőgomba laboratóriumi körülmények között könnyen fenntartható és szaporítható, emellett citológiai, biokémiai, genetikai, sőt már genomikai módszerekkel is kiválóan tanulmányozható, hiszen teljes genomszekvenciája ismert 2001 óta. Mivel a sejtciklus számos aspektusból konzerválódott az eukarióta élőlények evolúciója folyamán, fontos szabályozó proteinek és génjeik tucatjait élesztőgombákban fedezték fel először, és csak később találták meg homológjaikat emlős sejtekben. A legjobban ismert élesztőfaj ugyan a sarjadzással szaporodó, ipari jelentőségű pékélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*), vele szemben azonban a hasadó élesztő két lényeges, előnyös tulajdonsággal rendelkezik. 1.) A *S. pombe* sejtjei szimmetrikus keresztirányú osztódással szaporodnak, melynek eredményeként két csaknem azonos méretű leánysejt keletkezik, emiatt a tenyészet könnyen szinkronizálható. 2.) A hengeres alakú sejtek konstans átmérő mellett kizárólag a végeiken nőnek, ezért az egyes sejtek kora hosszuk alapján jól becsülhető mikroszkópos megfigyelések során.

Jelenlegi munkánkban a hasadó élesztő sejtciklusát a matematikai modellezés módszerével tanulmányozzuk. Ennek során először is egy "kapcsolási rajzot" készítünk, melyen szerepeltetjük a sejtosztódási ciklus szempontjából legfontosabbnak ítélt komponenseket, és a közöttük fennálló ismert vagy feltételezett biokémiai kapcsolatokat. A következő lépésben valamennyi komponens időbeli változási sebességére egy közönséges differenciálegyenletet írunk fel a biokémiai reakciókinetika törvényei szerint, majd pedig megbecsüljük ezek paramétereit. Ezután differenciálegyenlet-rendszerünket numerikus módszerekkel, számítógép segítségével oldjuk meg, és az így kapott szimulációkat kísérleti adatokkal teszteljük vad típusú sejtek és sejtciklus-mutások esetében egyaránt. Mivel kezdetben az illeszkedés biztosan nem megfelelő, modellünket iterációs eljárással korrigáljuk: a paramétereket (sőt sokszor a differenciálegyenleteket és a kapcsolási rajzot is) addig változtatjuk, amíg a szimulációk elég jól nem illeszkednek a kísérletekhez. Jelenlegi modellünk mintegy 60 különböző szimpla, dupla vagy még többszörös sejtciklus-mutáns fenotípusát írja le megfelelő pontossággal, továbbá néhány esetben megjósolja olyan további mutánsok viselkedését is, melyeket a genetikusok még elő sem állítottak.

Kutatásaink támogatásáért köszönetet mondunk az OTKA-nak (F 034100).

SZABÓ ANDRÁS¹, TÓTHMÉRÉSZ BÉLA², PELES FERENC¹, KERESZTÚRI PÉTER¹, IGLÓI ATTILA¹

Összehasonlító mikrofaunisztikai (protozoa, ciliata) kutatások hazai talajtípusokban

¹DE ATC Mezőgazdasági Mikrobiológiai Tanszék; ²DE TTK Ökológiai Tanszék, Debrecen

A mikrofauna tagjai (pl. protozoák) kis méretük és testfelépítésük következtében talán a legszorosabb kapcsolatban vannak környezetükkel, így ezek a szervezetek a legkisebb, a környezetükben bekövetkező változásokra is élesen reagálnak, ezért ezeknek a szervezeteknek a mennyiségi és minőségi ismerete fontos.

A protozoák (Ciliata) kutatása a talajokban nemzetközileg is, de különösen hazai vonatkozásban ez ideig háttérbe szorult. Kutatásaink során mi a különböző biológiai aktivitású szikes és csernozjom talajok protozoológiai (Ciliata) vizsgálatát, faunisztikai analizisét végeztük el. Tanulmányoztuk a kialakult Ciliata közösségek vertikális elhelyezkedését, struktúráját.

A szikes talajok esetében a mintavételi helyeket Hortobágyi Nemzeti Park (HNP) területén, az ősi állapotokat jól megtartó „magterületeken”, a degradációs szukcessziós sort jól jellemző, szikes növényi asszociációkban jelöltük ki.

A csernozjom talajok esetében a DATE Tangazdaság területén vettük a mintákat.

A talajmintákban a csillósok direkt egyedszámának meghatározására Foissner (1981, 1987, 1993) módszerét alkalmaztuk. A talajmintákban jelenlévő fajok fajspektrumát tenyésztéses módszerrel határoztuk meg.

A HNP talajaiban összesen 31 csillós (Ciliata) fajt mutattunk ki. A valóban a talajélethez alkalmazkodott, gyors en- és excisztáló fajok (*Colpoda cucullulus*, *C. inflata*, *C. steini*, *Platyophrya spumacola*, *Gonostomum affine*, *Uroleptus halseyi*, *U. mobilis*, *Tachisoma pellionella*, *Euplotes patella*) a HNP talajaiban dominánsak voltak.

A fajok megjelenését a humuszos réteg megléte, ill. a talajok nedvesség tartalma befolyásolta.

A vizsgálatok azt mutatták, hogy az előforduló fajok száma a talajok felső 0-5 cm-es rétegében magasabb, mint az alsóbb rétegekben. Aktuálisan csak a *Spathidium spathula*, *Colpoda cucullus*, *C. inflata*, *Holosticha violacea*, *Uroleptus halseyi*, *U. mobilis* tekinthető konstans-domináns fajnak a HNP talajaiban. Az előkerült fajok közül 5 faj és egy genusz új a hazai faunában (*Enchelys gasterosteus*, *Spathidium longicaudatum*, *Holosticha tetracirrata*, *Trachelostyla affine*, *Uroleptus caudatus*, *Perisincira sp.*).

A csernozjom talajokból összesen 34 genuszba tartozó 45 csillós faj került elő. Ezek közül 15 faj közül a savanyú feltalajú szolonyec talajokban talált fajokkal. A legfontosabb konstans-domináns fajok (*Spathidium amphoriforme*, *Sp. Spathula*, *Sp. muscicola*, *Sp. terricola*, *Colpoda cucullus*, *C. inflata*, *C. steini*, *Gonostomum affine*, *Amphisiella milnei*, *A. terricola*, *Aspidisca cicada*, *Holosticha violacea*, *Euplotes muscicola*, *Uroleptus halseyi*).

A csernozjom talajokban a felső 0-10-20 cm-es rétegben a legnagyobb a potenciális és az aktuális fajszám. Az alsóbb rétegekben sokszor még cisztát sem tudtunk kimutatni.

A fajok egyedszámát a nedvesség tartalom egyértelműen befolyásolta, ezért ettől függően a vizsgálati periódusban több egyedszám maximum alakult ki.

A szisztematikai nagycsoportok dominanciáját követve megállapítható, hogy a csernozjom talajokban a *Kinetophragminophorák* és a *Polyhymenophorák* közel azonos arányban vannak jelen. Az *Olygohymeniphorák* részarány csak 12%-os. A *Polyhymenophorákat* főleg a *Hypotrichidák* képviselik a faunában.

SZABÓ ANDRÁS¹, TÓTHMÉRÉSZ BÉLA², PELES FERENC¹

Hazai erdőtalajok mikroedaphon (protozoa, ciliata) kutatásának fontosabb eredményei

¹DE ATC Mezőgazdasági Mikrobiológiai Tanszék; ²DE. TTK. Ökológiai Tanszék, Debrecen

A hazai erdőtalajok protozoológiai (Ciliata) kutatása Varga (1933, 1935, 1936, 1958) valamint Gellért (1956, 1957, 1959) kutatásaival az 1950-es évek végén lezárultak. Újabban Szabó (2002, 2003) vizsgálja néhány erdő talajában (bükk, fenyő, tölgy) a protozoon faunát és a kialakult ciliata együttesek struktúráját.

Vizsgálatainkat a Bükk-hegységben (fenyőerdő és bükkerdő talajában), valamint a Debreceni-Nagyerdő tölgyeseinek (kocsányos- tölgy és vörös-tölgy erdők) talajában végeztük.

A talajmintákat helyben sterilizált ásóval vettük, és a mintavételi négyzet több pontjáról gyűjtöttük be a kb. 0.5 kg talajt.

A mintákat Foissner módszerével (1981, 1987, 1993) dolgoztuk fel, a fajspektrumot tenyésztéssel határoztuk meg.

A Bükk-hegységben (Bükkszentkeresz-Lófő tisztás) a **lucfenyvesek** (*Pinus silvestris*) alatti podzolos erdőtalajból 20 nemzetségbe tartozó 27 csillós faj került elő.

A fajok nagy része az avarszintből került elő. A legfontosabb fajok: *Halteria grandinella*, *Blepharisma elongatum*, *Chilodon geographicus*, *Chilodontopsis muscorum*, *Dexiotrichides centralis*, *Holosticha monilata*, *Litonotus cygnus*, *Vorticella astyliformis*, *Colpoda ecaudata*, *Dileptus monilata*, *Epispithidium terricola*, *Epispithidium amphoriphorme*, *Euplotes muscicola*.

Az egyedszámok alakulását, valamint a mintákban aktuálisan megjelenő fajok számát a talajok nedvesség tartalma elsődlegesen befolyásolta. Ennek megfelelően az erdőtalajokban is több egyedszám maximummal lehet találkozni!

A fenyőerdők talajában a *Kinetophragminophorák* aránya 51.6%. Jelentős a *Polyhymenophorák* (33.3%) és ezen belül a *Hypotrichidák* (22%) részvétele a faunában.

A **bükkerdő** (*Fagus silvaticus*) talajából 19 nemzetségbe tartozó 27 csillós faj került elő. A megjelenő fajok többnyire a felső avarszintből voltak kimutathatók. A mélyebb rétegek felé haladva az egyedszám egyre csökken. A bükkerdő talajában megtalált fajok nagy része a fenyőerdők talajából is ismert.

A szisztematikai nagycsoportok dominanciája alapján a *Kinetophragminophorák* a fajkészlet 44.4%-át teszik ki. A *Polygohymenophorák* részarány már alacsonyabb (18.5%), a *Spirotrichák* (*Hypotrichidák*) 37%-os megjelenésűek.

A **kocsányos tölgyerdő** (*Quercus robur*) talajában vizsgálatainkat a felső 15 cm-es rétegben végeztük. Kutatásaink során eddig 22 csillós (ciliata) fajt találtunk meg. A *Colpoda cucullus*, *C. steini*, *Glaucoma scintillans*, *Enchelys gasterosteus*, *Spathidium spathula*, *Uroleptus musculus*, *Vorticella microstoma* csillós fajok konstans-dominánsnak tekinthetők.

A kocsányos tölgyerdő talajában igen magas a *Gymnostomaták* (27.3%) részaránya, a *Vestibuliferák* jelenléte azonban alacsony (18.2%).

A **vörös tölgyerdő** talajából 19 csillós faj került elő. A kocsányos tölgyerdőben talált fajok közül meglepően csak kevés (8 faj) a közös faj. A relatív hasonlóság csak 24 %.

A *Colpoda* fajok, a *Holophrya simplex*, a *Spathidium spathula*, *Steinia candens*, a *Vorticella microstoma* rendszeresen előkerült (konstans-domináns fajok).

Az erdőtalajokból eddig megjelent csillós fajok közül 8 faj (*Chilodon geographicus*, *Chilodontopsis muscorum*, *Colpoda ecaudata*, *Dexiotrichides centrali*, *Dileptus monilata*, *Epispithidium terricola*, *Vorticella astyliformis*) ismereteink szerint új a magyar faunában.

SZABÓ MARIANNE, KRAUSZ ERZSÉBET, LAKATOS GYULA

Az epifiton ETS-aktivitása sekély vizeinkben

DE TTK Alkalmazott Ökológiai Tanszék, Debrecen

A sekély vizek, a sajátos felépítésük és változatos élőhelyeik alapján kiemelt jelentőségűek a vízi élőlények és a természetvédelem szempontjából. A kedvező fényellátottság eredményeképpen a parti öv növényzete a bentonikus szerves anyagtermelés egyik fő színtere.

A növények víz alatti felületein kialakuló bolyhos **bevonatba** szervesanyagok iszaprézecskek és a szerves törmelék rakódhat le, amely nem marad változatlan, hanem az anyagforgalomban átalakulhat ill. hasznosulhat az ott élő közösség életműködésében (pl. tápanyag- vagy táplálékforrás, búvóhely, stb.). A növényzet-élőbevonat szerkezetének és működésének ismerete a Kis-Balaton sekély vizű területein, a már rehabilitált és a későbbi árasztásra kerülő területeken, azért fontos, mert az élőbevonat felépítése és összetétele jelzi a különböző állapotú élőhelyeket, jellegzetes minőségi és mennyiségi módosulása pedig jól indikálja a vízminőségi, ökológiai helyzetet és annak változásait.

Az epifiton alapján történő ökológiai állapot ill. ökológiai státusz minősítés történhet a taxonómiai index (TPI) és nem taxonómiai perifiton index (NTPI) alkalmazásával, ami az élőbevonat szerkezetére és működésére vonatkozik és lehetővé teszi az élőbevonat klasszifikációját. Az általunk mért ETS (Elektron Transzport System) enzim aktivitás értékek a környezet állapotát illetve a vízminőség ellenőrzési vizsgálatokba szorosan beilleszkednek. Ezzel a biológiai mutatóval a vizek jellemző állapotát meghatározó nem taxonómiai perifiton index számát szeretnénk növelni a vizek ökológiai állapotának minősítéséhez.

Tanszékünkön tanulmányozzuk a vízi növények (természetes alzatok) élőbevonatát, középpontba helyezve a nád, a gyékény és a káka élőbevonatának vizsgálatát, kiemelten a ETS-aktivitás értékére,

összevetve a klorofill-a koncentrációjával, szerves anyag százalékaival mivel a rögzült életformájuk eredményeként ezen közösségek biomonitorozási értékűek, anyagforgalmi jelentőségűek és a vízminőség indikálásában betöltött integrált szerepük is közismert.

SZABÓ ZSUZSANNA, KRISTÓF KATALIN, CSER VIKTÓRIA, KARDOS SZILVIA, GHIDÁN ÁGOSTON, ROZGONYI FERENC

A 2001-2003. időszak klinikai mintáiból izolált MSSA és MRSA törzsek fenotípusaiban mutatkozó eltérések

Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Budapest

Izgalmas kérdés, hogy a meticillinre érzékeny és rezisztens törzsek, virulencia faktoraiban, antibiotikumok iránti érzékenységekben, és az általuk okozta fertőzések pathomechanizmusában tapasztalható-e szignifikáns különbség. E vizsgálatban 2001-2004 között laboratóriumunkban izolált 4097 *S. aureus* törzs különböző antimikrobiális szerek iránti érzékenységét hasonlítottuk össze.

A *S. aureus* izolátumok identifikálása tradicionális és molekulárbiológiai módszerekkel (kataláz, koaguláz, *nucA*) történt. Az antibiotikum érzékenység vizsgálatot korongdiffúziós módszerrel az NCCLS ajánlásoknak megfelelően, ill. PCR-vel végeztük el (*mecA*). A törzsek fágtipizálása is megtörtént.

A 2001-2003 években emelkedett az MRSA izolátumok száma és aránya, ill. az egyes izolátumok különböző antibakteriális szerekkel szembeni rezisztenciája is. Szignifikáns különbség mutatható ki az MSSA és MRSA törzsek között. A teljes vizsgálati periódus alatt az izolált *S.aureus* törzsek 7,8 %-a bizonyult MRSA-nak. Az egyes években azonban emelkedő gyakoriságot tapasztaltunk (2001: 3,75%, 2002: 7,08%, 2003: 10,59%). Az MRSA törzsek különböző antibakteriális szerekkel szembeni rezisztenciája szignifikánsan magasabb értékeket mutatott, mint a meticillin szenzitív törzseké (MSSA). A %-os rezisztencia arányok a következők voltak (MRSA/ MSSA): erythromycin 90/10; clindamycin 85/9; ciprofloxacin 82/1; doxycyclin 15/6; gentamicin 67/2; tobramycin 87/3; amikacin 70/2; sumetrolim 98/0,5. Az egyes években MRSA törzsek bizonyos típusú antibakteriális szerekkel szembeni rezisztenciája növekedést mutat (pl. makrolidok, linkosamidok, gentamicin), más típusú szereknél ez nem tapasztalható (pl. fluorokinolonok). Nem találtunk vancomycin, teicoplanin ill. linezolid rezisztens MRSA-t. A Magyarországon leginkább elterjedt, "623"-as fágtípusú klón volt a leggyakoribb (52,8%).

SZAKÁCS GYÖRGY, *NAGY VIVIÁNA

***Trichoderma* fajok alkalmazása ipari fermentációs folyamatokhoz**

BME Mezőgazdasági Kémia Technológiai Tanszék, Budapest

A *Trichoderma* fajok igen elterjedtek a természetben. Gyakoriságuk magyarázata között egyaránt szerepel gyors szaporodási képességük, változatos anyagcsere aktivitásuk és agresszív versenyző természetük. Igen sok *Trichoderma* erős cellulóz vagy hemicellulóz lebontó, mikotoxin vagy antibiotikum termelő, vagy más gombákkal szemben jelentős mikoparazita tulajdonságot mutat. Az ipari fermentációs alkalmazhatóságot tekintve a *Trichoderma* nemzetség – az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetségek mellett – valószínűleg a harmadik legfontosabb gomba genus-nak tekinthető. Napjainkban cellulázt, xilanázt és más enzimeket állítanak elő *Trichoderma* fajok felhasználásával. Továbbá, a növénypatogén gombák ellen bevethető ú. n. biokontrol szerek gyártása is fellendülőben van. A celluláz és hemicelluláz enzimeket felhasználják az élelmiszer-, állattakarmány, papír- és textiliparban. Távlati felhasználási lehetőségeket kínál a lignocellulózokból történő bioalkohol gyártás.

SZALMÁS ANITA¹, BÁNÁTI FERENC², KOROKNAI ANITA², SALAMON DÁNIEL², VERESS GYÖRGY¹, MINÁROVITS JÁNOS², GERGELY LAJOS¹, KÓNYA JÓZSEF¹

Interleukin-10 promóter metiláció és humán papillomavírus infekció humán keratinocita sejtvonalakban

¹DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Debrecen; ²Johan Béla OEK Mikrobiológiai Kutatócsoport, Budapest

A méhnyakrák kialakulásában a 16-os típusú humán papillomavírus az egyik fő tényező. A nem megfelelő citokin szintézis csökkentheti a helyi 1-es típusú (sejtes) immunválasz hatékonyságát és ezzel a későbbiekben elősegítheti a rák megelőző elváltozások kifejlődését. A 2-es típusú citokinek, mint például a humán interleukin 6 (hIL-6) és a humán interleukin 10 (hIL-10) fokozott termelése kapcsolatba hozható ezen folyamatokkal. A hIL-6-tól eltérően a hIL-10 gén inaktív keratinocitákban.

A promóter metiláció egyik epigenetikai mechanizmus az emlősök génextpressziójának szabályozásában. Azok a citozin bázisok, melyeket közvetlenül guanin követ (ún. CpG dinukleotidok) általában metiláltak az emlősgenomban. A génpromóterekben ezen dinukleotidok metilációja fordítottan arányos az adott lókuszt transzkripció aktivitásával.

Kísérleteink során a hIL-10 promóter metilációs mintázatát vizsgáltuk Na-biszulfitos DNS-modifikálást követő szekvenálással. Kezdeti kísérleteinkben keratinocita eredetű sejtvonalakat hasonlítottunk össze hIL-10 termelésére képes perifériális mononukleális sejtekkel (PBMC).

Hat CpG dinukleotid található a hIL-10 gén promóterében, a transzkripció startpontot megelőző 0,5 kb hosszúságú szakaszon a -373, -352, -350, -320, -185, -110 nukleotid pozíciókban. Mind a PHA-stimulált, mind a stimulálatlan PBMC sejtekben mind a hat CpG dinukleotid metilálatlanak bizonyult (0-25% metiláció), ezzel szemben a HPV-genomot nem hordozó keratinocita sejtvonalakban ezek a CpG dinukleotidok általában metiláltak voltak (75-100% metiláció). HPV-16 E6-tal stabilan transzfektált HaCaT sejtekben a CpG(-320), HPV-16 E7-tel stabilan transzfektált HaCaT sejtekben a CpG(-320) és (-185), és a teljes HPV-16 genommal stabilan transzfektált C-33A sejtekben a CpG(-373) és (-185) demetilálódtak.

Eredményeink alapján mondhatjuk, hogy a hIL-10 promóter metilációs minázata összefüggésben lehet a transzkripció aktivitással. Azonban a hIL-10 promóter metilációját méhnyakrák kialakulása során a HPV onkoproteineken kívül más tényezők is befolyásolhatják.

SZARKA KRISZTINA, TÓTH LÁSZLÓ, MAJOR TAMÁS, GERGELY LAJOS

P53 kodon 72 polimorfizmus szerepe laryngealis carcinomában

DE OEC, Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Debrecen

A laryngealis carcinoma incidenciája és mortalitása Magyarországon kiemelkedően magas. A carcinoma etiológiája máig nem tisztázott. A kémiai karcinogének (dohányzás, alkohol) mellett felmerült a mucotrop humán papillomavírusok (HPV) kóroki szerepe is, bár az irodalom nem egységes sem a HPV DNS előfordulási gyakoriságának, sem a HPV pozitívitas prognosztikai szerepének megítélésében. A HPV daganatkeltő hatása elsősorban az E6 és E7 virális onkoproteinek p53 és pRb inaktíváló hatásán keresztül érvényesül. A HPV E6-p53 interakciót befolyásolja a p53 tumorsuppresszor gén 72. kodont érintő polimorfizmusa [a p53Arg (A) izoforma érzékenyebb az E6-mediált degradációra, mint a p53Pro (P)], így a beteg p53 genotípusa (AA, AP vagy PP) befolyásolhatja a HPV-asszociált tumorok kialakulását és/vagy progresszióját. Munkánk során 33 laphámsejtes laryngealis carcinomában szenvedő beteg primer tumorából származó szövetmintáját vizsgáltuk. A HPV DNS kimutatása és tipizálása konszenzus nested MY/GP PCR-rel és az amplimerek restriktív hasításával történt. A betegek p53 kodon 72 genotípusának meghatározására allél-specifikus PCR-t használtunk, majd a genotípusok megoszlását - chi -négyzet próba felhasználásával - véradókból álló kontroll populáció (N=87) genotípus megoszlásához viszonyítottuk. Mintáink 51,5 %-ában (17/33) találtunk HPV-specifikus szekvenciát, hat esetben HPV6, négy esetben HPV11, hét esetben pedig HPV16 genotípust azonosítottunk, így a magas onkogén kockázatú (high risk) HPV genotípusok kizárólagos szerepét a laryngealis carcinoma kialakításában nem tudtuk igazolni. A p53 genotípusok megoszlása vizsgálati csoportjainkban a következő: · kontroll csoport: AA 60% (52/87), AP 36% (31/87), PP 4% (4/87); · összes laryngealis carcinomás beteg: AA 36% (12/33), AP 52% (17/33), PP 12% (4/33); · HPV-pozitív laryngealis carcinoma: AA 29% (5/17), AP 65% (11/17), PP 6% (1/17); · HPV-negatív laryngealis carcinoma: AA 44 % (7/16), AP 37% (6/16), PP 19% (3/16). Bár a p53 genotípusok gyakorisága nem különbözött szignifikánsan a vizsgálati csoportjainkban, a p53Pro allél halmozottan fordul elő a carcinomás betegek körében. Emiatt a laryngealis carcinoma esetében genetikai kockázati tényezőként felmerül a p53Pro allél szerepe mind homozigóta, mind heterozigóta formában, a HPV pozitív esetekben már a heterozigóta állapot is fokozhatja a genetikai kockázatot. Ezzel szemben a p53Arg izoforma jelenléte protektív hatású lehet. Eredményeink felvetik azt is, hogy a p53Arg/Pro allélok genetikai kockázati

tényező szerepe eltér a különböző malignus daganatokban, és a HPV-asszociált tumorokban szerepe független a HPV E6 onkoprotein hatásától.

SZARVAS JÓZSEF¹, HAJDÚ CSABA^{1,2}, NAGY ZOLTÁN¹, SZABÓ TAMÁS¹

PCR alapú fajtaelkülönítés a kétspórtás csiperkegomba (*Agaricus bisporus*) esetén

¹Quality Champignons Kft. Fajtakutató Laboratórium és Gombacsíra Üzem, Demjén; ²BCE Zöldség- és Gombatermesztési Tanszék, Budapest

Az ehető gombák termesztése majdnem eléri az évenkénti 2,5 millió tonnát a világon és ez a szám emelkedik. Ebből az összegből az *Agaricus bisporus* veszi ki a nagyobb részt a világ termelésének több mint 38%-ával, ezután a *Pleurotus ostreatus* és *Pleurotus ssp.* laskagomba következik 25%-al, a *Volvariella volvacea* 16%-al és a shiitake, *Lentinus edodes* 10%-al. A gombaipar dinamikus fejlődése az előző 10 évben jelentős nemzetgazdasági hasznot eredményezett. A gombatermesztés sikeressége többek között függ a rendelkezésre álló fajtáktól, a szaporítóanyag minőségétől melyet a különböző szubsztrátumok beoltására használnak. A magas színvonalú szaporítóanyagnak a biztosítása nem kis feladatot ró a nemesítőkre. A hibrideknek több elvárásnak kell megfelelniük, melyek fajonként változóak, sőt a piaci igényekhez is alkalmazkodniuk kell. A hazai gombatermesztésének domináló, favorizált faja is a kétspórtás csiperkegomba (*Agaricus bisporus*). Laboratóriumunk tíz éve foglalkozik a jelentősebb termesztendő gombák nemesítésével, melynek eredményeként ma már több *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* hibridet használnak a hazai és a külföldi termesztők. Az új fajták azonban könnyen klónozhatók, leolthatók, így más konkurens cégek is használhatják fajtáinkat. Sürgető feladatnak érezzük saját nemesítésű fajtáink levédésének jogi megalapozását. Molekuláris biológiai előkészítő vizsgálatokat végeztünk saját hibridjeink esetében, elsősorban fajtáink, továbbá a különféle termesztési problémákból visszaizolált hibridek azonosítására. Ennek érdekében PCR technikán alapuló fajtaelkülönítési módszert dolgoztunk ki a jelenlegi fontosabb piaci hibridjeinkre. A RAPD módszer eredményeként megjelenő differenciáló band-eket klónoztuk, szekvenáltuk és egyedi tervezésű primereket állítottunk elő, ami jól jellemzi *A. bisporus* hibridjeinket.

SZATHMÁRY ERZSÉBET^{1,2}, TÓBIÁS ISTVÁN³, PALKOVICS LÁSZLÓ^{1,2}

Egy rövidebb köpenyfehérjét tartalmazó természetes szilvahimlő vírus (plum pox virus) izolátum jellemzése

¹MBK Környezetbiotechnológiai Intézet, Gödöllő; ²BCE Növénykórtani Tanszék; ³MTA Növényvédelmi Kutatóintézet, Budapest

A szilvahimlő vírus (*plum pox virus*, PPV) a csonthéjas gyümölcsfajokon a legsúlyosabb károkat okozó vírus, mely komoly termésvesztést idéz elő a magyarországi szilva, kajszi és őszibarack ültetvényekben. Munkánk során különböző, Észak-kelet Magyarországról, különféle helyi szilvafajtákról származó PPV izolátumokat gyűjtöttünk be és vizsgáltunk meg. A vírusgenom 3' végének klónozásához a primereket úgy választottuk, hogy a PCR termék tartalmazza a vírus fő proteázának amino-terminális végét (kis sejtmagi zárványfehérje, NIa), a köpenyfehérjét (CP) és a 3'nem-transzlálódó régiót (3' UTR). Az egyes izolátumok PCR termékeit vizsgálva a B1298 jelű rövidebbnek bizonyult, így további vizsgálatoknak vetettük alá. A PCR terméket klónoztuk és nukleinsav sorrendjét meghatároztuk. A köpenyfehérje gén vizsgálatokor 135 nukleotid hosszúságú (45 aminosav) deléció mutattunk ki a fehérje amino-terminális végén. A PPV köpenyfehérjében lévő delécióra ez idáig csak két másik példa (PPV-NAT, PPV-SH) ismert (Maiss at al. 1989, Deborré at al. 1995). A PPV-NAT izolátum esetében 16 aminosav deléció mutattak ki, ami a levéltetűvel való átvihetőségért felelős DAG fehérje motívumot érintette. A B1298 izolátumban a mutáció nem érintette a DAG motívumot, mert a mutáció ez után helyezkedett el a genomon. A levéltetűvel való átvihetőségét megvizsgálva, azt találtuk, hogy ez az izolátum hasonló hatékonysággal vihető át, mint más delécióval nem rendelkező izolátumok. Ezt a rövidebb köpenyfehérje gént tartalmazó szakaszt beépítettük egy korábban elkészített fertőzőképes PPV klónba. A köpenyfehérje csere nem volt hatással a vírus létfontosságú életfolyamataira. A B1298 izolátum kimutathatóságát különböző cégek által forgalmazott antitestekkel teszteltük. A felhasznált antitestektől függően eltérő eredményeket kaptunk. Bizonyos

antitestek esetében az izolátum nem volt kimutatható.

Az ELISA technikák mind a mai napig a vírusok kimutatásának legfőbb módszerei. A leggyakrabban használt módszer a DAS-ELISA technika, amelyben a vírus köpenyfehérje különböző részeit felismerő poliklonális és monoklonális antitesteket használnak

Irodalom:

Deborré, G., Maiss, E. and Jelkmann, W. (1995): Biological and molecular biological investigations of several plum pox virus isolates. Acta Horticulturae 386, 253-262.

Maiss, E., Timpe, U., Briske, A., Jelkmann, W., Casper, R., Himmler, G., Mattanovich, D. and Katinger, H.W. (1989): The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA. Journal of General Virology 70 (3), 513-524.

SZATHMÁRY ZSUZSANNA¹, BÍRÓ JUDIT¹, DOBOS-KOVÁCS MIHÁLY², ERDEI NOÉMI¹, STIPKOVITS LÁSZLÓ¹

Az infertilitás vizsgálata libákban a *Mycoplasma* fertőzöttség tükrében

¹MTA Állatorvos-tudományi Kutató Intézet, Budapest

Libák esetében a *Mycoplasma* fertőzöttség gyakran párosul az ivarszervek rendellenességeivel, úgy mint phallus gyulladással, salpingitissel, csökkenő tojástermeléssel és növekvő embrió mortalitással.

Az utóbbi néhány évben Magyarországon több libaállományban észlelték a tojások nagy arányú (több, mint 80 %) terméketlenségét. Az elhullott és a vágott állatoknál légzsákgyulladás, fibrines hashártya gyulladás és salpingitis volt megfigyelhető.

A 2002-2003 években 11 állományból származó 33 tojó és 19 gúnár különböző szerveiből nyert mintáit vizsgáltuk meg. Tojók esetében az utherus minták 76,7 %-a volt pozitív Mycoplasmára, de ezen túlmenően a peritoneum minták 78,6 %-ából és a petetüsző minták 48,0 %-ából sikerült Mycoplasmát kimutatni. A gúnarakat vizsgálva a peritoneum minták 86,7 %-a mutatott pozitívítást Mycoplasmára nézve, de Mycoplasma kimutatható volt légzsákokból és herékből is.

A biokémiai és szerológiai vizsgálatok alapján az izolátumok nagyobbik része a *Mycoplasma sp. 1220* törzshöz hasonlít, kisebbik része pedig a *Mycoplasma anseris* fajba tartozott. Az izolátumok azonosítására PCR módszert fejlesztettünk ki, amely során a felszaporított 493 bp méretű DNS fragmentumot *ScrFI* és *FokI* restrikciós enzimekkel hasítva a *M. sp. 1220* törzshöz hasonló, valamint *M. anseris* törzsek egymástól és más baromfi Mycoplasma törzsektől is elkülöníthetőek.

SZEDLJAK ILDIKÓ¹, JUHÁSNÉ ROMÁN MARIANN², SZÁNTAINÉ KŐHEGYI KATALIN¹

Dohányok mikrobiológiai jellemzőinek vizsgálata fermentálás és tárolás során

BCE ÉTK ¹Gabona-és Iparinövény Technológia Tanszék; ²Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék, Budapest

A dohány növény levelei a talaj közelében helyezkednek el, így a betakarított levelek jelentős számú talaj eredetű mikroorganizmust hordoznak, melyeknek száma a feldolgozás során jelentősen megváltozhat. Irodalmi adatok bizonyítják, hogy a dohány fermentálásában bizonyos baktériumok és gombák aktivitása is közrejátszik. A dohányon és annak feldolgozási folyamatában dominánsak a *Bacillus megatherium*, valamint a *Penicillium* és *Aspergillus* nemzetséghez tartozó gombák. Raktározási kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a dohány levél felületére nemcsak talajból, hanem a feldolgozás és tárolás során is kerülhetnek mikroorganizmusok (*Aspergillus repens*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. flavus*), amelyek fontos szereplői lehetnek a fermentálás enzimikus folyamatainak. Munkánk célja, egy Magyarországon termesztett Virginia típusú (mesterséges szárítású) és egy Burley típusú (természetes szárítású) dohány mikrobiológiai állapotában végbemenő változások tanulmányozása a fermentálásra való előkészítés, a fermentálás és a tárolás során. A Virginia dohány nemcsak szárítási módban különbözik a Burley-dohánytól, hanem eltérő botanikai, fizikai és kémiai tulajdonságaiban is. A mintáink a V-Tabak Rt. Szolnoki Fermentáló Üzeméből származtak, a dohányokat 2003-ban termesztették. A mintavétel a következő fázisokban történt: - redrying kezelés előtt a keveréktároló silóból - a heves fermentációt követően a bálából - több hónapig tartó tárolás után (utó-fermentáció) Az összes telepképző mezofil, aerob mikroorganizmus meghatározása TGE agar táptalajon, 30 oC-os inkubálás után történt. Hasonló módon végeztük a mezofil, aerob, spóráképző baktériumok tenyésztését, azzal a különbséggel, hogy előtte a mintákból készített hígítási sorozatot 80

oC-on, 15 percen át hőkezeltük. A penészek és az élesztőgombák tenyésztéséhez és a telepek számlálásához bengálrózsa-agar táptalajt alkalmaztunk. Az inkubálás szintén 30 oC-on történt. A legjellemzőbb penészgombák-minőségi meghatározás céljából- izolálásra kerültek. Az izolált törzsek az Aspergillus és Penicillium nemzetséghez tartoznak. A fajok azonosításához a Thom és Raper módszert használtuk.

SZÉKELY ANNA¹, SIPOS RITA¹, BERTA BRIGITTA¹, BUJDOSÓ LÁSZLÓ², HAJDÚ CSABA², MÁRIALIGETI KÁROLY¹

Gombakomposztálás során a változó mikrobióta direkt DNS alapú és tenyésztéses feltérképezése potenciális oltótörzsek keresése céljából

¹ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszék, Budapest; ²Quality Champignons Kft. Fajtakutató és Molekuláris Biológiai Laboratórium, Demjén

A gombakomposztról szüretelhető csiperke (*Agaricus bisporus*) mennyiségét számos tényező befolyásolhatja, úgymint az alapanyagok minősége, a technológia fiziko-kémiai jellemzői (hőmérséklet, pH), valamint a lejátszódó mikrobiológiai folyamatok. Az alapanyagok minősége a beszerzési források miatt, a fizikai paraméterek pedig a kültéri folyamatokat erősen befolyásoló évszakos ingadozás miatt erősen változó paraméterek. Munkánk célja ezért a mikrobiológiai folyamatok standardizálásának megkísérlése oltó törzsek segítségével. Célunk eléréséhez először a komposztálás különböző fázisainak mikrobiótáját kívántuk megismerni. Ehhez direkt DNS izoláláson alapuló közösségi ujjlenyomat vizsgáló módszereket (DGGE, TRFLP) alkalmaztunk, amelyek segítségével nyomon követhettük a különböző fázisokhoz folyamatosan alkalmazkodó mikrobióta szukcesszióját. A DGGE (Denaturáló Grádiens Gélelektroforézis) egyedi fajokat reprezentáló csíkjaiból a DNS-t visszanyertük, és szekvencia-analízis segítségével ezeket a fajokat azonosítottuk. Mindezzel párhuzamosan tenyésztéses módszerekkel is vizsgáltuk a komposztot. A különböző fázisokból húspepton ill., komposztos táptalajon termofil körülmények között (45°C, 50°C és 55°C-os inkubáció) izolált törzseket egyben lehetséges oltótörzsként is megvizsgáltuk. A két eltérő vizsgálati módszer eredményei meglepően sok átfedéssel bírtak. A termofil fázisokat elsősorban Gram pozitívok (*Bacillus* sp., *Thermobifida* sp.) és a *Thermus* nemzetség tagjai jellemezték. Ez utóbbiakat csak a tenyésztés-független módszerekkel sikerült kimutatnunk. A *Pseudoxanthomonas* nemzetség tagjait minden fázisból sikerült tenyésztünk, a DGGE vizsgálat eredményei azonban arra utalnak, hogy ezek a baktériumok csupán a végső, csiperkével való beoltásra kész komposztban válnak dominánssá. Az izolált törzsek közül számos a komposztálás szempontjából fontos biopolimer bontó képességgel (pl. celluláz aktivitás) rendelkezik, ezért ezek potenciális oltótörzsek lehetnek.

SZEKERES ANDRÁS¹, LÁDAY MIKLÓS², *KREDICS LÁSZLÓ³, ANTAL ZSUZSANNA³, HATVANI LÓRÁNT¹, MANCZINGER LÁSZLÓ¹

Klinikai *Trichoderma longibrachiatum* izolátumok gyors meghatározása cellulóz-acetát elektroforézissel

¹SZTE TTK Mikrobiológiai Tanszék, Szeged; ²MTA Növényvédelmi Kutatóintézet, Budapest; ³MTA-SZTE Mikrobiológiai Kutatócsoport, Szeged

A *Trichoderma* nemzetségbe tartozó fonalgombák gazdasági jelentősége kiemelkedő: számos enzim és antibiotikum forrásai, növények növekedését serkentő organizmusok, elhalt növényi részek lebontói és általánosan alkalmazható biofungicidek is egyben. Ezek az imperfekt fonalgombák mára már az opportunistá patogén gombák egyre népesebb csoportját is gyarapítják. A legtöbb *Trichoderma*-fertőzésről peritoneális dialízissel kezelt, illetve legyengített immunrendszerű, transzplantált páciensek esetében tudósítottak. A *Trichoderma* fajok meghatározása morfológiai jellegeik és növekedési tulajdonságaik alapján sokszor nehézkes, mivel ezek a jellemzők folyamatos skálán helyezkednek el és gyakran átfedhetnek a nemzetségbe tartozó fajok között. Az opportunistá gombák gyors és pontos meghatározása azonban nagyon fontos lenne a megfelelő terápiás kezelések kiválasztása szempontjából. A molekuláris markerek használata egyre nagyobb teret hódít a fajhatárok felderítésében. Ezen módszerek közé tartozik a cellulóz-acetát elektroforézis, mely a gombafajok azonosítására használható,

gyors diagnosztikai eszköznek tűnik. Ebben a tanulmányban ezt a multilókusz enzim-elektroforézist alkalmaztuk 10 klinikai *Trichoderma* izolátum vizsgálatára. Tizenhárom enzim aktivitásának előzetes tesztelése során hét, a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PDH, E.C.1.1.1.49), a glükóz-6-foszfát-izomeráz (GPI, E.C.5.3.1.9), a 6-foszfoglükonát-dehidrogenáz (6PGDH, E.C.1.1.1.44), a peptidáz A, B, és C (PEP A, B, D, E.C.3.4.11-13) valamint a foszfoglükomutáz (PGM, E.C.5.4.2.2) alkalmasnak bizonyult az összes törzs tesztelésére.

A 6PGDH, GPI, PEP A, PEP B és PGM enzimrendszereknél egy sáv detektálása volt általános, a PEP D elektromorfok két sávot tartalmaztak, míg a G6PDH két és három sávú mintázatot mutatott a vizsgált izolátumokban. Összehasonlítva a kapott elektroforetikus típusokat nem klinikai eredetű izolátumok típusaival, az alkalmazott enzimek megfelelő molekuláris markerek *Trichoderma* fajok meghatározására, számos közülük pedig alkalmas lehet diagnosztikai célokra. Ezt a törzsek ITS-szekvenciáiból nyert adatok is megerősítették. Mivel a klinikai *Trichoderma* izolátumok nagy része a *Longibrachiatum* szekcióba tartozik, feltehető, hogy a más *Trichoderma* fajok legyengített immunrendszerű és dializált betegekben történő előfordulásáról tudósító esetleírások nem pontosak. Az orvosi diagnosztikumban szükség lenne ezért egy gyors, olcsó és megbízható diagnosztikai módszerre, mellyel a *T. longibrachiatum* törzsek azonosíthatók. A jelenlegi tanulmányban kifejlesztett módszer ígéretesnek tűnik erre a célra.

A munka az F037663-as számú OTKA-pályázat támogatásával készült.

SZEKERES ANDRÁS¹, LEITGEB BALÁZS^{2,3} *ANTAL ZSUZSANNA⁴, KREDICS LÁSZLÓ⁴, HATVANI LÓRÁNT¹, MANCZINGER LÁSZLÓ¹

A biokontroll index kiszámítása *in vitro* antagonizmus tesztek képanalízisével

¹SZTE TTK Mikrobiológiai Tanszék; ²MTA SZBK Biokémiai Intézet, ³ Biofizikai Intézet; ⁴MTA-SZTE Mikrobiológiai Kutatócsoport, Szeged

A biológiai növényvédelemben alkalmazható mikroorganizmusok (biocontrol agens: BCA) a környezetbarát növényvédelem egyik legígéretesebb eszközei. Számos képviselőjük rendelkezik kimagasló antagonizáló képességgel növénypatogén gombákkal szemben, s így sikeresen alkalmazhatóak e kórokozók által előidézett növénybetegségek leküzdésére. Az antagonizmus folyamata különböző mechanizmusokon alapul, melyek közé sorolható az antifungális metabolitok termelése, a kompetíció az élettérért és a táplálékért, valamint a mikoparazitizmus. A mezőgazdasági alkalmazás céljaira használt gombafajok közül számos tartozik az Ascomycota törzs Hypocreales rendjének *Trichoderma* nemzetségébe, mely a nemzetség tagjainak kiemelkedően gyors növekedésével, valamint jelentős mennyiségű antibiotikum- és extracelluláris enzim-termelésével hozható összefüggésbe. A folyamat összetettségének következtében azonban nehéz előre megjósolni a szinergizmus fokát, továbbá a BCA-k viselkedését a természetes patológiás rendszerekben, ezért szükséges egy modell rendszer, amely alkalmas e tulajdonságok pontos mérésére és meghatározására.

A korábbi tanulmányokban általános módszerként az *in vitro* agarlemeztes kísérletek szerepeltek, melyek információtartalma jól megfeleltethető az *in vivo* vizsgálatok nyújtotta eredményeknek. Megfelelő, szabványosított mérési módszerek és eszközök hiányában azonban e vizsgálatok kiértékelése nem ad összehasonlítható eredményt a világ távoli laboratóriumaiban vizsgált, különböző potenciális biokontroll izolátumok esetében. Munkánk célja ezért az volt, hogy a BCA-k biokontroll tulajdonságainak mennyiségi kiértékelésére kifejlesszünk egy pontos képanalízisen alapuló módszert, valamint, hogy megfelelő szabványosított körülményeket javasoljunk az *in vitro* antagonizmus-vizsgálatokhoz, melyek révén a más-más időben és különböző helyszíneken elvégzett tesztek eredményei összehasonlíthatóvá válnak.

Négy *Trichoderma* izolátumot vizsgáltunk az általánosan használt gombatáptalajok két típusán, két -világméretben is jelentős- növénypatogén fonalgombával (*Microdochium nivale* NRRL 3289 és *Fusarium culmorum* NRRL 29371) szemben. A javasolt új módszer szerint a növénypatogén gombák telepeinek táplemezen elfoglalt területeit a digitális fényképeken kijelölt területek mérésével számítottuk ki. A területek kiszámításához a Scion Image programot használtuk. A gátló hatást a biokontroll indexszel (BCI) jellemeztük, amelyet a patogén gombák telepterületének arányából számítottunk ki: a telep területe az *in vitro* antagonizmus esetén / a telep területe a kontroll esetén. Az általunk javasolt módszert számos környezeti tényező figyelembevételével teszteltük. A kapott eredmények alapján megállapítható,

hogy az általunk bevezetésre javasolt BCI alkalmas a gombaizolátumok biokontroll tulajdonságainak pontos mérésére és törzsek közötti összehasonlítására.

A kutatómunka az OTKA F037663, és az OMFB 00219/2002 pályázatának támogatásával készült.

SZÉNÁSI ZSUZSANNA

Protozoonok molekuláris diagnosztikájának kihívásai

Johan Béla OEK Parazitológiai Osztály, Budapest

A parazitózisok epidemiológiájának megismerése kulcsfontosságú a hatékony diagnosztikai, kezelési és megelőzési módok kifejlesztésében. Nagyon fontos, hogy a szakemberek tökéletesen ismerjék az ilyen adatok gyűjtésére alkalmas módszerek lehetőségeit, de korlátait is. A direkt mikroszkópia széleskörűen használatos a parazitás fertőzések diagnosztikájában, de a mikroszkópizálás munka- és időigényes, igen gyakorlott szakembert igényel és még így is nem mindig eléggé szenzitív. A szerológiai módszereknek számos előnyük mellett nem kevés a hiányosságuk is. E hátrányok jelentősen csökkenthetők a fehérje és főleg a nukleinsav alapú molekuláris biológiai módszerek folyamatos fejlesztésével. Elsősorban a PCR (polymerase chain reaction) és az ezen alapuló módszerek, mint a PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA), nested PCR, real-time PCR bizonyultak igen értékesnek az új epidemiológiai, diagnosztikai és terápiás ismereteknek a megszerzésében, illetve hasznosításában. A molekuláris biológiai technikákkal tanulmányozott protozoonok közül megemlítjük az *Acanthamoeba*, *Entamoeba histolytica*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma cruzi*, *Cryptosporidium* fajokra vonatkozó eredményeket, kissé részletesebben pedig a *Toxoplasma gondii* és főleg a *Plasmodium* speciosekkel kapcsolatos problémákat. A DNS alapú módszerek jelen formájukban nem egyszerűek, a vizsgálatok több lépcsőben folynak. Az erre szolgáló laboratóriumok felállítása, a műszerek és a reagensek beszerzése meglehetősen költséges. Feltehető, hogy a molekuláris biológiai módszerek nem fogják feleslegessé tenni a mikroszkópos és szerológiai vizsgálatokat, de azokkal együtt segítségünkre vannak a biztosabb parazitológiai laboratóriumi diagnózis felállításában, a terápia hatékonyságának megállapításában, továbbá rendkívül fontos új adatokat szolgáltatnak a parazita és a gazda, a parazita és a vektor közti bonyolult kapcsolat részletesebb feltárásában és pontosabb megismerésében.

SZENTIRMAI ATTILA

Azetidinon szerkezetű metabolitok képződése; 50 év kutatási eredményei

DE TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék, Debrecen

Több mint ötven évvel ezelőtt, 1951 tavaszán a Szegedi Egyetem biológia-kémia szakos hallgatójaként találkoztam az Általános Biológia gyakorlatot demonstrátorként vezető Ferenczy Lajossal. Később - 1955-ben - a sors kegyeltjeként, a Gyógyszeripari Kutató Intézet (GyIKI) mikrobiológiai osztályára kerülve az ismeretség szakmai tartalommal bővülő barátsággá fejlődött. Fejlesztési céllal a Debrecenben elindult penicillin gyártás indokolta a GyIKI-ben a β -laktám szerkezetű antibiotikum képződésének vizsgálatát.

Alaptörzsként szolgált egyrészt az NRRL-1951-B-25 valamint a Wis Q 176 *Penicillium chrysogenum* törzs. Időnként egy-egy nemesített variáns frissítette az állományt. A hatvanas évektől a cephalosporin C termelésre képes *Acremonium chrysogenum* nemesített variánsa is vizsgálatra került. Később összehasonlító törzsként megjelent az *Aspergillus nidulans*.

Alapkutatási programként szerepelt a katabolikus represszió jelensége, amely döntően befolyásolta az idiofázisban képződő hasznos termék megjelenését. A céltermék képződés élettani hátterének felderítése közben kapott adatok közül ipari vonatkozása miatt csupán a fővonalból kiágazó kísérleti eredmények kerülhettek. Hosszú ideig a penicillin fermentáció tejcukor szénforráson folyt világszerte. A glükóz, bár a konidium csírázása és a micélium növekedése szempontjából ideális szénforrás, mégis a G-penicillin képződés szempontjából jelenléte katasztrófális. Ez a monoszacharid nemcsak a bioszintézisben részt vevő enzimek képződését zavarta, de az élettani viszonyok alakításán keresztül a végtermékképződést is gátolta. A káros hatás poliszacharid, illetve oligoszacharid szénforráson egyaránt jelentkezett, mert az indukálható amiláz hatására felszabaduló glükóz, illetve az indukálható invertáz hatására nádcukorból

képződő glükóz-fruktóz elegy jelentősen csökkentette a penám váz képződését. A laktóz előnyös hatása magyarázandó volt, mivel a β -galaktozidáz által lebontott tejcukorból glükóz és a gombáknál β -galaktozidáz képződést indukáló galaktóz szabadul fel. A megjelenő enzim hatására felszabaduló glükóz mennyisége pedig előidézheti a gátló hatást. Ez figyelhető meg az *A. chrysogenum* tenyészetben, ahol a laktóz nem javította a termékképződést. Eredményes volt viszont az ididofázisban szénforrásként növényi olajat használni. Ez esetben a glükóz neogenezis során képződő G-6-P szolgáltatja a szekunder metabolit termék képződéséhez szükséges NADPH szintet. (10-12 NADPH /molekula.) A penicillint termelő törzsből izolálva a laktózt bontó fehérjét kiderült, hogy az valójában glükózaminidáz dimer, amelynek képződését nem befolyásolja sem a laktóz, sem a galaktóz, Így az idofázisban levő tenyészetet visszafogott mértékben látja el szén és enrigiaforrásként hasznosuló (glükóz és galaktóz) monoszacharidokkal.

- Horváth I., Bajusz S., Szentirmai A., 1959. Inhibitory action of amino acid esters on the production of extracellular amylase by *Penicillium chrysogenum*. Nature 183:477
- Horváth I., Szentirmai A., 1959 Inhibitory effect of fungistatic antibiotics in the production of amylase by *Penicillium chrysogenum*. Nature 184 : 57-58
- Horváth I., Szentirmai A., Bajusz S., Parragh É., 1960. The production of the inductive amylase by *Penicillium chrysogenum*. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 7 : 19-29
- Horváth I., Szentirmai A., 1960. The mode of inhibition of induced amylase synthesis by nystatin. Antibiot. Chemother. 10/5 : 303-305
- Szentirmai A., 1964. Production of penicillin acylase. Appl. Microbiol. 12/3 : 185-187
- Kozma J., Bartók G., Szentirmai A. 1993. Fructose-2,6-bisphosphate level and beta-lactam formation in *Penicillium chrysogenum*. J. Basic Microbiol. 33/1 : 27-34
- Pócsi I., Pusztahelyi T., Bogáti M., Szentirmai A., 1993. The formation of N-acetyl- β -D-glucoaminidase(NAG) is repressed by glucose in *Penicillium chrysogenum*. J.Basic Microbiol. 33/4 : 259-267
- Oláh A., Papp Zsuzsanna, Szentirmai A., 1993. Inulin formation of penicillin producing industrial *Penicillium chrysogenum* strains. Acta Microbiol. Hung. 40/4 : 379-386.
- Emri T., Bartók G., Szentirmai A., 1994. Regulation of specific activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phospho-gluconate dehydrogenase in *Penicillium chrysogenum*. FEMS Microbiol. Letters 117 : 67-70
- Bogáti M., Pócsi I., Maticsek J., Boross P., Tözsér J., Szentirmai A. 1996. NADP-specific glutamate dehydrogenase of *Penicillium chrysogenum* has a homo-hexameric structure. J. Basic. Microbiol. 36/5 : 371-375.
- Karaffa L., Sándor E., Kozma J., Szentirmai A., 1997. Methionine enhances sugar consumption, fragmentation, vacuolation and cephalosporin-C production in *Acremonium chrysogenum* Process Biochem. 32/6 : Karaffa L., Sándor E.M., Kozma J., Kubicek C., Szentirmai A. 1999 The role of the alternative respiratory pathway in the stimulation of cephalosporin C formation by soybean oil in *Acremonium chrysogenum*. Applied Microbiology and Biotechnology 51:633-638
- Nagy Z., Kiss T., Szentirmai A., Biró S. 2001. β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, Purification, and Characterization of the Enzyme. Protein Expression and Purification 21: 24-29
- Pócsi I., Emri T., Sami L., Leiter E., Szentirmai A. 2001 The glutathione metabolism of the beta-lactam producer filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. Acta Microbiol Immunol Hung 2001;48(3-4):393-411.
- Nagy Z., Keresztessy Z., Szentirmai A., Biro S. 2001 Carbon source regulation of beta-galactosidase biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. J Basic Microbiol. 2001;41(6):351-62.
- Karaffa L., Fekete E., Sandor E., Sepsí A., Seiboth B., Szentirmai A., Kubicek CP. 2002 Carbon catabolite repression in the regulation of beta-galactosidase activity in *Aspergillus nidulans*. Acta Microbiol Immunol Hung. 2002;49(2-3):261-5.
- Fekete E., Karaffa L., Sandor E., Seiboth B., Biro S., Szentirmai A., Kubicek CP. 2002 Regulation of formation of the intracellular beta-galactosidase activity of *Aspergillus nidulans*. Arch Microbiol. 2002 Dec;179(1):7-14.
- Ilyes H., Fekete E., Karaffa L., Fekete E., Sandor E., Szentirmai A., Kubicek CP. 2004 CreA-mediated carbon catabolite repression of beta-galactosidase formation in *Aspergillus nidulans* is growth rate dependent. FEMS Microbiol Lett. 235(1):147-51.

SZILÁGYI ZSOLT, BATTÁ GYULA, ENCZI KLÁRA, SIPICZKI MÁTYÁS

Fork-head típusú transzkripciós faktorok a hasadó élesztőben

DE TTK Genetikai és Molekuláris Biológiai Tanszék, Debrecen

A fork-head típusú transzkripciós faktorok közel tizenöt éves múltat tekintenek vissza. Az elsőként izolált ilyen típusú regulátort *D. melanogaster* fork-head mutánsának elemzése során azonosították. Napjainkig fork-head regulátorokat számos emlős fajban (köztük az emberben) többsejtű szervezetekben

és egysejtű eukariótákban is azonosították. Funkciójukról egyre több információ áll rendelkezésre, amely alapján elmondható, hogy kulcsfontosságú szerepük van a sejtosztódási folyamatok és sejt differenciálódási folyamatok szabályozásában, valamint az embriogenezisben is.

A fork-head típusú regulátorok szerepének tanulmányozása egyszerű eukariótákban, a már bizonyítottan jelentős modellszervezetként számon tartott *Saccharomyces cerevisiae*-ben indult el, ahol a gének elemzése azt mutatta, hogy jelentős szerepet játszanak a sejtosztódási folyamatok szabályozásában.

Különösen a sejt ciklus kutatások terén igen jelentős modellszervezet, a *Schizosaccharomyces pombe* hasadó élesztő fork-head génjeinek tanulmányozása szintén nagymértékben hozzájárulhat a regulátorok szerepének megértéséhez. A két már részben jellemzett fork-head gén tanulmányozása megmutatta, hogy – hasonlóan más szervezetek fork-head génjeinél tapasztaltakhoz – mindkét gén szerepet játszik sejt differenciálódási és sejtosztódási feladatok szabályozásában. Munkacsoportunkban történt meg az egyik regulátor (*sep1*) azonosítása és jellemzése. A *sep1* gén elemzése megmutatta, hogy kulcsfontosságú szerepet játszik a citokinezis végrehajtásában, valamint a mitózissal történő összehangolásában. Eredményeinek azt mutatják, hogy a *sep1* gén terméke posztranszlációs szabályozás alatt áll, amelynek szerepe lehet a fenti feladatok ellátásában.

A hasadó élesztő genom szekvenciájának meghatározása lehetővé tette egyéb, ismeretlen funkciójú fork-head típusú regulátorok azonosítását és azok funkcionális genomikai megközelítéssel történő vizsgálatát. Azonosítottunk két további fork-head típusú regulátort, valamint elkezdtük szerepük vizsgálatát. A deléciós mutánsok elkészítését követő genetikai és citológiai vizsgálatok megmutatták, hogy egyikük (*fhp2*) ugyancsak szerepet játszik a sejtosztódási folyamatok szabályozásában, míg másikuk (*fhp1*) nagy valószínűséggel nem rendelkezik ilyen funkcióval.

Eredményeinek azt sugallják, hogy a távoli rokon faj (*Saccharomyces cerevisiae*) fork-head génjei szerepéhez hasonló szerepet játszhatnak a tanulmányozott fork-head gének is. Ez azt sugallja, hogy az evolúció során a gének szerepe elsődlegesen a kulcsfontosságú sejt ciklus folyamatok ellátása volt, majd a többsejtes szerveződés megjelenésével együttjáró további szabályozási feladatok megoldása érdekében funkciójuk kiszélesedett, amely együtt járt a fork-head gének számának erőteljes növekedésével.

SZLÁDEK GYÖRGYI¹, JUHÁSZ ATTILA³, KARDOS GÁBOR², MAJOR TAMÁS⁴, TAR ILDIKÓ⁵,
GERGELY LAJOS^{1,2}, SZARKA KRISZTINA²

A TT vírus (TTV) koinfekció fokozhatja a humán papillomavírus (HPV) onkogén hatását gégekarinómában

¹MTA Tumorvírus Kutatócsoport; ²DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet; ³DE OEC Bőrgyógyászati Klinika; ⁴DE OEC Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika, Debrecen

A TTV egy kisméretű, burok nélküli vírus, 3,8 kilobázis hosszúságú genomját egyszálú, cirkuláris DNS alkotja. A TTV széles körben előforduló vírus, TTV DNS-t számos emberi szövettípusból sikerült már kimutatni, azonban a TTV kóroki szerepe a mai napig tisztázatlan. Az eredeti elképzelést - mely szerint a TTV-nek bizonyos májgyulladások kialakításában lenne szerepe - vizsgáló tanulmányok egymásnak ellentmondó eredményeket mutatnak. Újabb közlemények felvetették a TTV mint kóroki illetve koinfekciós tényező szerepét más betegségek (légúti megbetegedések, aplasztikus anémia) esetében.

A gége daganatos megbetegedései igen gyakran fordulnak elő a magyar lakosság körében. A tumorképződés etiológiai háttere és a betegség továbbfejlődésében szerepet játszó hatások még nem teljesen tisztázottak. Felvetődött a HPV, mint kóroki tényező szerepe is, de a HPV tumorfejlődésre gyakorolt hatását vizsgáló tanulmányok nem egybehangzóak.

Munkánk során megvizsgáltuk, hogy a TTV-HPV koinfekció és a laphámsejtes gégekarinóma kifejlődése és progressziója között van-e kapcsolat? A TTV és HPV előfordulási gyakoriságát PCR segítségével határoztuk meg 40 egészséges egyén, illetve tíz rekurrens laringeális papillomatózisban, öt malignizált papillómában, és 25 gégekarinómában szenvedő beteg szövetmintáiban. A kapott adatokat a betegség progresszióját figyelembe véve elemeztük. Azon 11 beteg esetében, akiknél metasztázis vagy recidíva volt tapasztalható, magas arányban (72%) találtunk HPV-TTV koinfekciót, míg a 14 tumor-progresszió mentes beteg esetében nem volt kimutatható koinfekció. A mindkét vírussal fertőzött karcinómás betegek esetében szignifikánsan rosszabb volt a tumormentes túlélés ($p < 0,001$). Az öt beteg közül, akiknél a papillomatózis malignus transzformáción ment át, négy szintén fertőzött volt mindkét vírussal.

A HPV és TTV közötti együttműködés természetének felderítése még további vizsgálatokat igényel, de az 1. genocsoportba tartozó TTV-vel illetve HPV-vel való koinfekció egyértelműen összefüggésbe hozható a gégekarzinómák rossz klinikai kimenetelével.

SZMOLKA ANNAMÁRIA¹, NÓGRÁDY NOÉMI², RÁSKY K.³, PÉTERFY F.³, NAGY BÉLA¹

A PCR és ELISA alkalmazásának lehetőségei a baromfi *Salmonella* monitoring programokban

¹MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet; ²Johan Béla OEK Fág és Molekuláris Epidemiológiai Osztály; ³Diagnosticum Rt., Budapest

A baromfi állományok *Salmonella* fertőzöttsége számos fejlett országban az érdeklődés középpontjában áll, amiatt, hogy a humán salmonellosisnak igen gyakori forrása a baromfi fertőzöttsége. Kellően hatékony ellenőrzési (monitorozási) rendszer nélkül egyetlen járványügyi mentesítési vagy gyérítési program sem érheti el célját, ezért a fenti célokon belül elsődleges feladat a *S. Enteritidis* és *S. Typhimurium* kimutatási rendszerek javítása, különös tekintettel a baromfiállományokra.

A jelenlegi klasszikus bakteriológiai módszert a baromfiipar bizonyos igényeihez képest lassúnak tartjuk. Ezért munkánk célja az volt, hogy a jelenleginél gyorsabb, specifikusabb eredményre vezető, hatékonyabb (és így hosszabb távon költségtakarékosabb) módszereket bocsássunk egy beindítandó hazai *Salmonella* monitoring program rendelkezésére, az ELISA és a PCR technika alkalmazásával.

Saját előállítású monoklonális ellenanyagokra alapozott DAS-ELISA-val és a szakirodalomban publikált, általános *Salmonella* kimutató PCR primer valamint szerovar (*S. Enteritidis* és *S. Typhimurium*) specifikus PCR primerek adaptálásával olyan *Salmonella* kimutató rendszert alakítottunk ki, mely a fenti igényeket kielégítheti.

Eredményeink az alábbiakban foglalhatók össze:

PCR és DAS-ELISA rendszerekkel előzetes vizsgálatokat végeztünk különböző mesterségesen fertőzött mintákkal (baromfi bélsár, -vakbél, -takarmány és -hús) annak szűrőrendszerkénti alkalmazhatóságának meghatározására.

A peptonvizes elődúsítóra kidolgozott PCR rendszerek a vizsgált bélsár, vakbél., takarmány-, és hús mintákban lényegében a bakteriológiai eredményekkel összhangban mutatták ki a *Salmonella* jelenlétét és érzékenységük is megegyezik a bakteriológiai módszerek érzékenységevel (10^2 - 10^3 cfu/ml), kb. 95%-os specificitás mellett.

A DAS- ELISA rendszereket különböző un. „vad” vakbél és csirkehús mintákkal is vizsgáltuk és a kapott eredményeket összehasonlítottuk a bakteriológiai és a PCR általános *Salmonella* primerpárral kapott eredményekkel. Ennek alapján megállapítható, hogy a módszer érzékenysége - mint azt a mesterségesen fertőzött mintáknál is meghatároztuk és várható is - elmarad a PCR módszer érzékenységétől (kb. 10^6 - 10^7 cfu/ml) specificitása viszont megegyezik a PCR módszernél kapott eredményekkel.

Mindkét módszernek nagy előnye a hagyományos módszerrel szemben az, hogy 48 órán belül (de egy délelőtti mintaérkezés esetén a másnapi munkaidő végére) a pozitív minták túlnyomó többségét ki tudja mutatni, s ezen felül a PCR módszer arra is választ ad, hogy a *Salmonella* kontamináció *S. Enteritidis* vagy *S. Typhimurium* eredetű-e (amely információ jelenleg is kiemelt fontosságú).

SZOMOR KATALIN, PAPP DÁNIEL, DENCS ÁGNES, RUSVAI ERZSÉBET, BROJNÁS JUDIT, TAKÁCS MÁRIA

Aktív és passzív immunizálás ellenére HBsAg hordozóvá vált gyermekek hepatitis b vírusainak nukleotidsorrend-vizsgálata

Johan Béla OEK Virologiai Főosztály, Budapest

Magyarországon 1995-ben vezették be a terhes kismamák HBsAg szűrését. A pozitívnak bizonyult kismamák újszülöttjeit születéskor azonnal passzív illetve aktív immunizációban részesítik. A HBsAg pozitív édesanyától született, később HBV hordozóvá vált gyermekek aránya az oltás bevezetése után ~0,8%. Az oltás hatékony védelmet nyújt a hepatitis B vírus által okozott fertőzések kivédésére. Irodalmi adatok alapján a vírus felszíni fehérjében (HBsAg) bekövetkezett aminosav-cserék, amelyeket egy vagy két pontmutáció indukál, elegendőek lehetnek ahhoz, hogy a mutáns fehérjével

rendelkező vírus kijátssza az immunrendszert. Célunk az volt, hogy egy bizonyosan oltott, de mégis HBsAg-pozitív populációban vizsgáljuk meg a betegek és hordozók vírusait (7 születéskor immunizált gyermek, 1 oltott felnőtt). Összehasonlításképpen -információink alapján- nem oltott, 3 akut és 5 krónikus hepatitisben szenvedő beteg vírusát vizsgáltuk. Meghatároztuk a felületi fehérjét kódoló szakaszról készült, 200 bp hosszú PCR-termék nukleotid-sorrendjét. A vizsgált szakaszon számos helyen találtunk csendes, illetve aminosav-cserét eredményező mutációt. A mutáns HBsAg fehérjére jellemző aminosav-csere (Gly->Arg a 145-ös helyen), az általunk vizsgált mintákban nem fordult elő. Meghatároztuk a vírusok genotípusait is, főleg A és D típusokat találtunk. Ez megegyezik a korábbi, más génszakaszon végzett genotípus-meghatározási eredményeinkkel. A vizsgált minták között előfordult azonban egy-egy B és F genotípusokhoz hasonló vírus is, amelyek feltehetően importált esetek.

SZŰCS GYÖRGY

Patogének detekciójának nehézségei környezeti mintákban

Baranya megyei ÁNTSZ Virologiai Osztály, Pécs

A természetes és mesterséges környezetünkben lévő mikroorganizmusokkal a környezet mikrobiológia, mint interdiszciplinális tudományterület, foglalkozik. A hagyományos taxonómia szerint a mikroorganizmusokat öt nagy csoportba soroljuk: a „sejtes” (sejtmembránnal rendelkező) algákra, baktériumokra, gombákra és protozoonokra, valamint az „acelluláris” vírusokra. Ezek a mikroorganizmusok nagyon összetett - és még csak kis részben ismert - interakciókban vannak egymással és makrokörnyezetükkel, és alapvetőek a biogeokémiai ciklus fenntartásában, ami a földi élet folyamatosságának alapja. A kölcsönhatások – egyszerűsítve – neutrálisak, pozitívak vagy negatívak lehetnek az egyes szervezetekre aszerint, hogy előnye vagy hátránya van-e belőle a résztvevőknek. A patogén mikroorganizmusok, noha a kölcsönhatások nem fixáltak (lásd: opportunistáknak), „előnyt” húznak az emberrel, állatokkal, növényekkel való kapcsolatukból, amiket az ember igyekszik kivédeni. – Külső környezetünkből, a vízből, talajból, kevésbé a levegőből - (amelyek elsősorban átvívó közegek) a patogének és anyagcsere-termékeik kimutatása napjaink módszer-sokféleségével sem egyszerű. A prokarióták diverzitása, nagyságuk, a környezetben lévő számuk, nagyfokú metabolikus flexibilitásuk, kevert populációik (lásd: biofilm), stb. mind-mind kimutatásukat limitáló tényezők.

Az előadás az új analitikai képalkotó mikroszkópos vizsgálati lehetőségektől kezdve a legújabb molekuláris módszerekig (bioriporterek, bioszenzorok, mikropróbák, stb.) kísérletet tesz a kimutatási nehézségek felvázolására, és víz-virologiai példákkal illusztrálja a problémákat. Az előadó reméli a résztvevők aktív közreműködését, hozzájárulását - a már sajnos a bioterrorizmust is érintő - témakör minél szélesebb és alaposabb megvitatásához.

TAKÁCS JUDIT

Peptonok - fermentációs alkalmazása - termékbemutató

Becton-Dickinson Hungary Kft., Budapest

Az előadásban a peptonok előállítási folyamatairól és ezen folyamatoknak a sejtek növekedésére és anyagcserejére gyakorolt hatásáról beszélünk.

A fehérjék, mint az élő szervezetek nélkülözhetetlen strukturális és funkcionális elemei, változó számú peptidkötéssel kapcsolódó aminosavat tartalmazó láncokból állnak és rendkívül komplex strukturát alkotnak. A fehérjék hidrolízis útján alkotóelemeikre, peptidre, aminosavakra bonthatók. Ez lehet egy erőteljes savas hidrolízis vagy éppen proteolitikus enzim bontás.

A savas hidrolízis egy durva eljárás, általában magas hőmérsékleten zajlik, és valamennyi peptidkötést képes megtámadni, bizonyos esetekben még az egyes aminosavakban is kárt tesz.

A proteolitikus enzim hidrolízis sokkal enyhébb eljárás, nem igényel magas hőmérsékletet és általában bizonyos peptidkötés típusokra specifikus.

A hidrolízis körülményei, mint a felhasznált enzim mennyisége, az emésztés időtartama, a pH és hőmérséklet egyértelműen meghatározzák a hidrolízis fokát és ezzel együtt a hidrolizátum minőségét.

A különböző pepton vagy peptonokat tartalmazó komplex fermentációs táptalajok azzal az előnyös tulajdonsággal rendelkeznek, hogy a mikroorganizmusok széles köre számára biztosítja a növekedést,

elősegíti a tápanyag igényes mikroorganizmusok növekedését is viszonylag alacsony költségigényűek. Új fermentációs táptalaj kifejlesztése során, számos különböző peptonféléssel történő egyedi kísérletek javasoltak az optimális peptone vagy peptone-kombináció kiválasztásához. Ebben az előadásban bemutatjuk milyen hatást gyakorol a peptonok molekula súlyuk, hidrolízisük típusa valamint a kiindulási fehérje jellege révén a különböző organizmusok anyagcseréjére

TAKÁCS KRISZTINA, *PESTI MIKLÓS

A *Schizosaccharomyces pombe* δ pap1 jelátviteli mutánsának génexpressziós vizsgálatai kadmium kezelés hatására

PTE TTK Általános és Környezeti Mikrobiológia Tanszék, Pécs

Kísérleteink során *Schizosaccharomyces pombe* szülői törzsét és a belőle származó MAP kináz kaszkád jelátviteli mutánsait (δ wis1, δ sty1, δ atf1, δ pap1, δ sin1), valamint az L972/K vad típusú törzset használtuk. A MAP kináz kaszkád tagjai (Wis1, Sty1) bizonyítottan az Atf1, Sin1, Pap1 transzkripció faktorokon keresztül szabályozzák a különböző stresszfolyamatokban a célgének expresszióját [1].

Vizsgáltuk számos stresszor (oxidatív ill. fém stresszorok) hatását a jelátviteli mutáns törzsekénél. A minimális gátló koncentrációra vonatkozó kísérleti eredmények alapján, a Cd²⁺ a Wis1-Sty1-Pap1 jelátviteli láncon keresztül fejtheti ki hatását. A továbbiakban a Cd²⁺ kezelés során bekövetkező folyamatokra koncentráltunk, hogy meghatározzuk a jelátviteli mutánsoknál a molekuláris folyamatokat és a kadmium által indukált géneket.

Kadmiummal szemben a δ pap1 mutáns érzékenynek bizonyult, amelyet a -Cd detoxifikációban meghatározó szerepet játszó- mért alacsony glutation koncentráció is megmagyaráz. Génbanki adatok és microarray mérések alapján azon gének expresszióját vizsgáltuk, amelyek szerepet játszanak a sejt kadmium detoxifikációs folyamataiban [2, 3]. Munkánk során 0,5 mM CdSO₄-al kezeltük a törzseket 0, 30, 60, 120, 240 perces kezelési időt alkalmazva, rázatott tenyészetnél. Az általunk kiválasztott gének (*SPCC794.01c*-glükóz-6-foszfát 1-dehidrogenáz, *gsa1*, *hmt1*, *hmt2*, *sod1*, *sod2*, *trx2*) expresszióját reverz-transzkriptáz PCR és northern blot technikával határoztuk meg.

RT-PCR technikával megállapítható volt, hogy minden eddig vizsgált gén egyaránt expresszáldott a vad és a δ pap1 mutáns törzsbén, tehát ezen gének expressziója független a Pap1 transzkripció faktoról, s nem ezen gének okozzák a δ pap1 törzs Cd²⁺ érzékenységét. A génexpresszió mértékét, az esetleges indukciót illetve repressziót northern blot technikával vizsgáltuk. Megállapíthatjuk, hogy a *hmt1* (szulfid-quinon oxidoreduktáz) a vad és a δ pap1 törzsbén is expresszáldódik, de igen kis mértékben és az expresszió szintje számottevően nem változik az idő függvényében a kadmium kezelés hatására. A *sod1* (Cu/Zn szuperoxid dizmutáz), a *sod2* (Mn szuperoxid dizmutáz), *trx2* (thioredoxin) és a *hmt2* (vakuoláris transzporter fehérje) gének expressziója erőteljes, de szintén nem változik.

A jövőben kísérleteket fogunk végezni további olyan génekkel, amelyek részt vesznek a sejt kadmium detoxifikációs folyamataiban. A génexpressziós vizsgálatokat enzimaktivitás mérésekkel is szeretnénk alátámasztani. Vizsgálni fogjuk fluoreszcens mikroszkóppal a Pap1 transzkripció faktor sejtbeli lokalizációját Cd²⁺ kezelés hatására a δ pap1 törzsnél, melyet pREP41-pap1-GFP transzformálunk.

1. Banuett, F. (1998). Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to filamentous Fungi. Microbiol. and Molecular Biol. Reviews, Vol.62, No.2, 249-274.
2. Chen, D., Toone, M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., and Bähler, J. (2003). Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. Mol. Biol. of the Cell, Vol. 14, 214-229.
3. <http://www.sanger.ac.uk/>

TAKÁCS TÜNDE, VÖRÖS IBOLYA

Az arbuskuláris mikorrhiza gomba oltóanyagok mezőgazdasági és környezetvédelmi alkalmazásának lehetőségei

MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete, Budapest

A szárazföldi ökoszisztémákban általánosan elterjedt a gombák és növények közti mutualista szimbiózis, azaz kölcsönösen előnyös együttélés típus a mikorrhiza. A mikorrhizák legősibb és legelterjedtebb típusa az arbuskuláris mikorrhiza (AM). A növények gyökerében élő AM-gombák a

növények táplálkozását, ellenállóképességét a tápanyagok felvételére, a gyökerek növekedésére és morfológiájára, tápanyagfelvételi mechanizmusára, továbbá a növények különböző élettani és fejlődési folyamataira gyakorolt direkt és indirekt hatásuk révén képesek befolyásolni. A gazdanövények számára a gombapartner jelenléte jobb talajkihasználást tesz lehetővé mind tápanyag- mind vízfelvétel szempontjából. Az AM-gombával fertőzött, ún. mikorrhizás növények szárazsággal, tápanyaghiánnyal különböző biotikus és abiotikus stressztényezőkkel szemben (patogének, só, nehézfémek stb. okozta stressz) tanúsított ellenállóképessége nagyobb, mint a nem mikorrhizáltaké.

Az AM-gombák elsősorban légyszárú növényekkel élnek együtt és legtöbb természetű növényünk gyökerét kolonizálják, de szimbiózisban élnek egyes fásszárú növényekkel is. Hazai éghajlaton gyümölcsfáink (pl. alma, barack, szilva), a szőlő, erdőalkotó és telepített fák közül pl.: nyár, akác, juhar, kőris, éger, fűz stb. gazdanövényei az AM-gombáknak. Az AM-gomba oltóanyagokkal történő oltás, elsősorban a tápanyag- és vízellátás javításán keresztül elősegíti a mikroszaporított, mikorrhizás gyümölcs-csemeték üvegházba történő kiültetéskor ill. konténerezéskor fellépő ún. akklimatizációs stressz leküzdését. Irodalmi adatok szerint az AM-gombák jelenléte kb. 20-30- (60)%-al csökkenti a csemeték pusztulási veszteségét. A mikorrhizás fák hamarabb „fordulnak” termőre a termés minősége (egészségi állapot, nagyság, cukortartalom) jobb, mennyisége pedig nagyobb, mint a kontroll növényeké. Az AM-gomba oltások a talajunt területek gyümölcsfákkal történő újratelepítése esetén kiküszöbölhetik a csemeték tömeges pusztulását, növelik a gazdanövény ellenállóképességét a talajuntságot kiváltó abiotikus és biotikus stressztényezőkkel szemben. Fitoremediációs folyamatokban fontos szerepet tulajdoníthatunk az AM-gombáknak. A talajok szennyezettségétől függően fitoextrakciós vagy fitostabilizációs céloknak megfelelő fémtoleráns, szelektált AM-gomba növény párok megválasztásával a nehézfémmentesítése megoldható ill. a szennyezők táplálékláncba jutásának kockázata csökkenthető. A növények táplálkozásában ellenállóképességének növelésében betöltött pozitív szerepük lehetőséget ad az AM-gomba oltóanyagok mezőgazdaságban történő gazdaságos felhasználására, a kijuttatott műtrágya, növényvédőszer adagok és egyéb kemikáliák mennyiségének és erdő- vagy gyümölcsös telepítések kapcsán az átültetés okozta veszteség csökkentése révén. A környezetvédelem, mint is alkalmazhatja őket teszt-szervezetként vagy ritka, eltűnőben lévő növények " megmentésénél", szennyezett talajok remediációja kapcsán.

A jelen dolgozat alapjául szolgáló vizsgálatok az OTKA F042543, T038046 sz. pályázatok keretén belül készültek.

TÁNCSEICZ ANDRÁS, SZABADOS ISTVÁN, RÉVÉSZ SÁRA, PÓR TAMÁS, MÁRIALIGETI KÁROLY

Aromás szénhidrogének lebontásának vizsgálata, a lebontás kulcsenzimeinek (C12O és C23O) aktivitásvizsgálata

ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszék, Budapest

A benzol, a toluol és a xilol (BTX-vegyületek), valamint ezek származékai a magasabb rendű élőlények számára mérgező, „életidegen” anyagok. Számos mikroba képes azonban ezen vegyületek lebontására és szénforrásként való hasznosítására. Az aromás gyűrű bontása alapvetően kétféle útvonalon valósulhat meg: az „orto” és a „meta” útvonalon. Mindkét anyagcsere útvonal közös köztes terméke a katekol, amelynek aromás gyűrűje a lebontás következő lépésében felhasad. Az orto útvonal esetében ezt a reakciót a katekol 1,2-dioxigenáz enzim katalizálja, míg a meta útvonal esetében ezt a feladatot a katekol 2,3-dioxigenáz látja el. A két lebontási útvonal egyszerre csak ritkán működik, és ha ez elő is fordul, az egyik útvonal lényegesen kisebb intenzitással működik, mint a másik. Sokkal gyakoribb, hogy egy adott aromás vegyület csak az egyik útvonal enzimeinek expresszióját váltja ki. Mivel az előbb említett enzimek termékei, illetve ezek keletkezése fotometriáson detektálható, az enzimek aktivitása mérhető, és ezáltal a törzsek lebontási képessége jellemezhető.

Ilyen tulajdonságokkal rendelkező baktériumok izolálása volt a cél a BKV Rt. Budai járműjavítójánál vett talajmintákból. A minták, amelyeket 4 méteres mélységből vettünk, közepesen, valamint erősen szennyezettek voltak kenőolajjal és gázolajjal. A minták összes szénhidrogén tartalma 698 mg/kg és 10600 mg/kg között volt (kontroll minta: <50 mg/kg). A mintákból gázolajos dúsító táptalajon törzseket izoláltunk. A vizsgálatokhoz azokat a törzseket választottuk ki, amelyek a legígéretesebbnek mutatkoztak arra, hogy a BTX-vegyületeket egyedüli szénforrásként hasznosítani tudják, majd a 16S

rDNS-ük alapján identifikáltuk őket. A *Rhodococcus erythreus*, a *Stenotrophomonas maltophilia*, a *Streptomyces lateritius*, a *Microbacterium oxydans* és egy *Janthinobacterium* törzs viszonylag magas benzol, toluol vagy xilol koncentrációt is képesek voltak tolerálni és ezen vegyületeken növekedni. A BTX-vegyületeken kívül vizsgáltuk még a ftálsav, a nátrium-benzoát, a fenol és a diklór-benzolok lebontását. A dioxigenáz enzimek aktivitásának mérését három törzs esetében végeztük el, amelyeket benzollal inkubáltunk, és az alábbi „erősorrendet” sikerült felállítani köztük: *Rhodococcus erythreus* > *Microbacterium oxydans* > *Janthinobacterium* sp.. Az eredményekből az is látható, hogy ezen törzsek esetében a benzollal történő indukció során kizárólag az orto útvonal aktiválódik.

TAPASZTI ZSUZSANNA¹, FORGÁCH PETRA¹, KÖVÁGÓ CSABA¹, BAKONYI TAMÁS¹, HORNÁK ÁKOS¹, DORON HAREL¹, GRAŻYNA TOPOLSKA², RUSVAI MIKLÓS³

A fekete anyabölcső vírus közép-európai izolátumainak filogenetikai vizsgálata

¹SZIE ÁOTK Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék, Budapest; ²Varsói Mezőgazdasági Egyetem Állatorvostudományi Kar Klinikai Tudományok Tanszék, Varsó, Lengyelország

Magyarországi méhészetek vírusfertőzöttségének felmérése során néhány méhmintából reverz transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR) segítségével sikerült kimutatnunk a mézelő méh (*Apis mellifera* L.) fekete anyabölcső vírus (Black Queen Cell Virus, BQCV) nukleinsavának jelenlétét. A vírusfertőzés tünetei az anya-álcák bábozódási zavarában illetve elhullásában nyilvánulnak meg, de a BQCV jelen lehet a dolgozó méhekben is, tünetmentes formában. A vírusfertőzést nagyobb gyakorisággal figyelték meg *Nosema apis* egysejtű parazitával fertőzött méhcsaládokban. A 30 nm átmérőjű pozitív szimpla szálú RNS vírus a *Dicistroviridae* család *Cripavirus* nemzettségébe tartozik. Genomja 8550 nukleotid hosszúságú és két nyitott leolvasási keretet (open reading frame ORF) tartalmaz: az ORF1 nem strukturális proteinek, az ORF2 strukturális proteinek kódol. A génbankban elhelyezett, dél-afrikai referencia genom alapján tervezett oligonukleotid primer-párok segítségével BQCV-specifikus nukleinsav-szakaszokat amplifikálunk fel magyarországi, lengyelországi és ausztriai méhmintákból. A törzsek strukturális fehérjéit és a helikáz enzimet kódoló régiók részleges szekvenálását követően összehasonlítottuk a különböző földrajzi helyekről származó vírusok nukleotid-sorrendjét. Az európai törzsek egymással 96-98%-os azonosságot mutattak, a dél afrikai törzshöz viszont csak kisebb fokban (87-93%) hasonlítottak. A genotípusok rokonsági viszonyait a szekvencia analízis eredményei alapján felállított filogenetikai törzsfák segítségével ábrázoltuk.

TAUBER TAMÁS, TÓTH ERIKA, KOVÁCS HAJNA

Velencei-tavi üledékminták mikrobiológiai vizsgálata közösségi kinonspektrumuk alapján

ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszék, Budapest

A Velencei-tó hazánk második legnagyobb sekély vizű szikes tava, melynek mai arculata a XX. század eleji vízszabályozó és az 1960-as években végzett rekreációs munkák során alakult ki. Az 1991 és 1993 közötti szárazság okozta krízisállapot óta élővilágának védelme megnövekedett hangsúlyt kapott, vízminőségének, ökológiai állapotának ellenőrzésére kormányhatározatban (1031/1995.) előírt monitoring program működik. Ennek keretében folyik karakterisztikus élőhelyeinek (pl. szulfurétum, nyílt vízterek) biológiai monitorozása. Ebbe a munkába kapcsolódtunk be mi is 2003 nyarán és őszén vett minták kinonprofiljának meghatározásával. A kinonok, mint kemotaxonomiai markerek, a közösségek taxonomiai összetételéről és a csoportok abundanciaviszonyairól nyújtanak információt. Mintáink két nádasoktól körülvárt (Német- és Lángi-tisztás), két nyíltvízi (Agárd és Fürdető) valamint egy szintén nyíltvízi, de rendszeres kotrással folyamatos zavarásnak kitett (Kajakpálya) élőhelyről származtak.

A talajmintákat először diklór-metán : metanol 1:2 arányú elegyében, foszfát-puffer jelenlétében egy éjszakán át kevertettük. Tíz perces ultrahangos kezelést követően a mintákat 12 órán át állni hagytuk, majd a szerves fázist Whatmann-papíron átszűrve különítettük el a talaj szilárd alkotóitól. Vákuumos bepárlást (Rotadest 2118) követően a lipidoldékony anyagok extraktumát kloroformban vettük fel, majd szilikagél alapú oktadecil oszlopon szeparáltuk a kinonokat a gliko- és foszfolipidektől. A kinontartalmú frakciót Kieselgel 60 F₂₅₄ típusú szilikagél vékonyrétegen tisztítottuk tovább (eluens: hexán-dietiléter

55:10). A rétegről visszanyert kinonokat acetonitril : izopropanol 65:35 eluens használata mellett magas nyomású folyadék kromatográffal vizsgáltuk (Pharmacia LKB 2248 pumpa, oszlop: ODS Spherisorb, Uvikord II detektor).

Nyáron az üledékek kinonok szerinti hasonlósága szoros egyezést mutatott a helyszínek makromorfológiai sajátjaival. Őszi ez a hasonlóság megszűnt, a nyílt vízi területek jelentős változáson mentek át. A legszembeötlőbb nyárról őszi mutatott változás a hosszú és/vagy telített láncú menakinonok majd minden mintában tapasztalható feldúsulása volt. Ebből aktinobaktériumok elszaporodására következtethetünk, ami pedig a tó szervesanyag-terhelésének őszi növekedését valószínűsíti, hiszen igen sok jelentős szaprotróf szervezet kerül ki ezen mikrobák köréből. Ezzel összhangban áll a további tapasztalat, miszerint a zárt, nádasokkal övezett területek mutatták a kisebb változást e téren, míg a vízádókhöz közeli nyílt vizek a legnagyobbat. Kajakpálya területén, ahol a nyáron észlelt tömeges halpusztulás nyomán extrém nagy szervesanyag-felhalmozódással számolhatunk, megjelentek az anaerob lebontási folyamatokban szereplő szulfátléggző baktériumokra (pl. *Desulfobulbus*, *Desulfovibrio*) jellemző kinonok is.

TAVASZI ÁKOS, SZAKÁCS GYÖRGY

Alacsony hőmérsékleten növekedő *Trichoderma* gombák izolálása és vizsgálata szilárd fázisú fermentáció alkalmazásával

BME Mezőgazdasági Kémiai Technológiai Tanszék, Budapest

Az elmúlt évtizedekben világszerte számos felismerés és kísérlet született a biológiai növényvédelem területén. A kutatások célja, hogy csökkentsek a természetbe kerülő kémiai növényvédőszer mennyiségét, de ugyanakkor kiaknázzuk a biológiai kontroll élőlényekben rejlő potenciális lehetőségeket. A fonalas gombák közül elsősorban a *Trichoderma* nemzetséghez tartozó fajokra jellemző a mikoparazitizmus. Igen sok izolátum mutat kiemelkedően magas kitináz és glükánáz enzimtermelést, amivel képesek más növénypatogén gombák sejtfalát bontani. Az eddigi kutatások során azonban csak néhány *Trichoderma* faj biokontroll képességét vizsgálták, és ezek döntő többsége mezofil volt. A kutatómunka során a nemzetség egy speciális csoportjával, az alacsony hőmérsékleten növekedő *Trichoderma* törzsekkel foglalkoztunk. A jelenleg piaci termékként forgalmazott *Trichoderma* készítmények egyike sem alkalmas igazán mérsékelt égvön őszi-téli-kora tavaszi biológiai növényvédelemre, ilyen célok eléréséhez új *Trichoderma* törzsekre van szükség. A kutatás első részében Oroszországi hideg területekről származó talajmintákból izoláltunk + 10 °C-on *Trichoderma* törzseket. Az izolálás és tisztítás eredményeként 4 talajmintából 9 *Trichoderma* törzset sikerült izolálnunk. Továbbá, kanadai, amerikai és finn talajmintákból további 14 „hidegtűrő” *Trichoderma* törzset izoláltunk. A kutatás második részében 23 alacsony hőmérsékleten növekvő izolátumot vizsgáltunk meg kétféle hőmérsékleten (20 °C-on és 30 °C-on) 5 növénypatogén gomba (*Rhizoctonia solani*, *Pythium debaryanum*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium sclerotiorum*) ellen Petri csészés ún: konfrontációs (dual culture) kísérletekben. Két törzs, a TUB F-1170 és a TUB F-1173 jelű mutatott jó mikoparazita képességet a növénypatogén gombák ellen. Tizennégy, alacsony hőmérsékleten növekedő *Trichoderma* törzs kitináz enzimtermelését is megvizsgáltuk, szilárd fázisú fermentáció keretében, 4 féle táptalajon, 20 °C-on. Nem találtunk közvetlen összefüggést a mikoparazita képesség és a kitináz enzimtermelés között. A TUB F-1170 és a F-1173 jelű erős antagonista törzsek kitináz enzimtermelése búzakorpa-kitin keverék táptalajon közepes mértékű volt. Ugyanakkor gyenge mikoparazitizmust mutató törzs jó kitináz enzimtermeléssel tűnt ki. A termelt kitináz enzim hőmérséklet optimuma 20 °C körüli értéket mutatott.

TÓTH ERIKA, TAUBER TAMÁS, BOHUS VERONIKA

Kemotaxonomiai markerek felhasználása mikrobiális biodiverzitás vizsgálatára

ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszék, Budapest

A mikrobiális ökológia hagyományos vizsgálati módszerei mellett egyre inkább tért hódítanak a tenyésztéstől független molekuláris biológiai és kemotaxonomiai módszerek. Bár a molekuláris ujjlenyomat módszerek finomabb felbontásra képesek a kémiaiaknál, utóbbiak javára írható alacsonyabb

költségvonzatuk, általában kisebb időigényük, valamint az a tény, hogy torzítás nélkül képezik le az eredeti mikrobiális közösség sokféleségét. Kutatásaink során egy olyan talajok és üledékek közösségi biodiverzitás vizsgálatára alkalmas módszert dolgoztunk ki, amellyel egyazon mintából megállapítható az adott életközösség sokfélesége respiratórikus kinonprofilja (RQ) és foszfolipid zsírsavjai (PLFA) alapján, valamint foszfát alapon becsülhető biomasszájuk.

A módszer beállításához egymástól makromorfológiai tulajdonságaiban és kémiai paramétereit tekintetében eltérő talaj és üledék mintákat alkalmaztunk (Bódvarákó, Rudabánya, Dobódél, Kréta, Eger, Zabszék, Velencei-tó). A mintákból a lipidoldékony anyagok extrakciója diklórmetán:metanol:foszfát puffer 1:2:1 arányú elegyében valósult meg. A szerves fázist a talaj illetve üledék szilárd alkotóitól szűréssel (Whatman 2Chr) különítettük el, majd vákuumos bepárlást (Rotadest 2118) követően kloroformban vettük fel. A kinonok, foszfolipidek és glikolipidek szeparálása BB C18 oktadecil-szulfát oszlopon történt kloroform, aceton és metanol eluensekkel. A kinontartalmú frakciót vékonyrétegen tisztítottuk tovább (Lieselgel 60 F₂₅₄) majd HPLC (Pharmacia pumpa 2248, Uvicord SII detektor) segítségével vizsgáltuk. A foszfolipidek analíziséhez a komponensek transzmetilálása után HP 5890 gázkromatográfot használtunk. Az adatok statisztikai elemzését főkomponens analízissel (PCA) a Syntax 2000 programcsomag segítségével valósítottuk meg.

Eger, Kréta és Dobódél valamint Zabszék mintái mind kinonprofiljuk, mind közösségi zsírsamintázatuk alapján egymáshoz hasonlóknak bizonyultak: ezekben a mintákban a közönséges talajlakó baktériumokra (pl. *Bacillus*, *Cytophaga*, *Flexibacter*) jellemző kinonok és zsírsavak mellett az Enterobacteriaceae családra jellemző kemotaxonómiai markereket találtunk, ami korrelál ezen minták fekális szennyezettségével. A Zabszéki minta annak ellenére került ebbe a csoportba, hogy kémiai paramétereit tekintve a legszélsőségesebb tulajdonságokkal bírt, itt érhető tetten módszerünk egyik korlátja. A rudabányai és velencei-tavi üledék minták minden tekintetben egy csoportba kerültek, mindkét esetben egyrészt aktinobaktériumok (*Streptomyces*, *Glycomyces*, *Actinomyces*) másrészt szulfátredukáló baktériumok (*Desulfobacter*, *Desulfovibrio*) jelenlétét detektáltuk. Mellettük jelentős mennyiségben mutattunk ki mikroeuکاریótákat is: a velencei tavi mintából *Penicillium* és *Paecilomyces* mikrogombákra, valamint mitokondriumokra jellemző kinonokat detektáltunk, a rudabányai mintában élesztő-specifikus kemotaxonómiai markereket mutattunk ki. A bódvarákói minta annak ellenére elkülönült a többitől, hogy kémiai paramétereit tekintve átlag közeli helyzetet foglalt el: több olyan kinont és zsírsavat is találtunk benne, amely jelenlegi tudásunk alapján egyetlen ezidáig leírt taxonból sem ismert.

TÓTH ISTVÁN¹, LANCZ ZSUZSA², NAGY BÉLA¹

Szarvasmarha eredetű *Escherichia coli* O157 és verocitotoxin-termelő *E. coli* (VTEC) törzsek magyarországi monitorozása és jellemzése

¹MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet; ²Országos Élelmiszervizsgáló Intézet, Budapest

Az *Escherichia coli* O157 (EHEC) ill. Vero/Shiga toxin-termelő *E. coli* (VTEC/STEC) súlyos közegészségügyi problémát jelent világszerte. Mivel a STEC a fő rezervoárját a kérődzők, elsősorban a szarvasmarhák jelentik, ezért célunk volt a hazai vágómarhák és tejelő tehének *E. coli* O157 és STEC hordozásának monitorozása, és az izolált törzsek geno- és fenotípusos jellemzése. A három vágóhídról és egy gazdaságból származó egészséges szarvasmarhák remeséből (n=428), széklet (n=214) és tej (n=114) mintáit vizsgáltunk O157- specifikus mágneses szeparációs (IMS) módszerrel és "VTEC-screen" kittel. A minták egy részét O26- és O111-specifikus IMS is vizsgáltuk. A remeséből minták 7,4 %-a (32/428), a nyerstej minták 7 %-a (8/114) és a széklet minták 2,8 %-a (6/214) tartalmazott *E. coli* O157 törzset. A minták 6 %-a (46/756) tartalmazott VT-termelő baktériumot, ebből összesen 22 VTEC (9 O157, 1 O26 és 12 OX) törzset tudtunk azonosítani. Az izolált *E. coli* O157 törzsek változatos pathotípusúak voltak: 17,4 % (8/46) bizonyult tipikus EHEC-nek (stx, eae), 69,6 % (32/46) atípusos EPEC-nak (eae-pozitív, EAF-negatív), 2,2 % (1/46) volt STEC, és 10,8 % (5/46) törzs nem rendelkezett sem stx, sem eae génnel. A remeséből eredetű (n=7) és bélsárból izolált (n=1) O157 EHEC törzsből az stx1 és stx2 gént, a tej eredetű (n=1) O157 EHEC törzsből az stx2 gént mutattuk ki. Az O157 törzsek szinte egységesen rendelkeztek az enthly génnel, gyakran volt kimutatható a paa, és espD, és az enteroaggregatív hőstabil toxin (east1) gén. Egyetlen törzsben sem fordult elő a cnf gén. Összesen 8 törzsből mutattuk ki a cdtB gént, az 5 tipizált gén egységesen cdtB-III. Az *E. coli* O157 törzsek

egységesen motilisek voltak, és H7 csillót termeltek, nem bontották a szorbitot, nem termeltek colicint, s a törzsek egyike sem bizonyult multirezisztensnek. A 13 nem-O157 VTEC törzsből 6 rendelkezett stx1, stx2 génekkel, két törzs stx1, egy törzs stx2 génnel, 4 törzs esetében nem-tipizálhatónak bizonyult a hordozott stx gén. A nem-O157 szerocsoportú VTEC törzsek közül egy Stx1-termelő törzs volt EHEC-pathotípusú. Összegezve, előszelekciós módszerekkel irodalmi adatokkal egyező gyakorisággal izoláltunk *E. coli* O157 és nem-O157 VTEC törzseket, s hoztunk létre egy reprezentatív törzsgyűjteményt. Vizsgálataink szerint a hazai szarvasmarhák által hordozott *E. coli* O157:H7 törzsek zöme nem tekinthető magas virulenciájú humán pathogén EHEC-nak. Rendelkeznek viszont azon feltételekkel, melyek alapján – a fágok által közvetített stx gén esetleges felvétele által – EHEC törzssé alakulhatnak.

A munkát elősorban az NKFP 04/040/2001. kutatási program támogatta, melyen belül a cdt- és stx gének analízise az OTKA T037890 ill. a T034970 szerződések részét képezi.

UJVÁRI DORINA¹, SOMOGYI ESZTER², LOMNICZI BÉLA¹

Nem csirke eredetű avirulens baromfipestis vírus (NDV) törzsek genetikai vizsgálata

¹MTA Állatorvostudományi Kutatóintézet; ²ELTE TTK, Budapest

A baromfipestis (Newcastle-betegség) vírus (NDV) törzseknek két nagy, egymást át nem fedő rezervoárja létezik a természetben: az egyik a szabad vizeken élő vad vízimadarak, a másik az ember által tartott csirkék. Az előbbieken szinte kizárólag avirulens NDV törzsek élnek, zömük egyetlen csoportban, az I. genotípusban található. Ezzel szemben, a csirkékben szinte kizárólag csak virulens törzsek fordulnak elő, idő- és térbeli eloszlást mutató számos (II. – VIII.) genotípusban. A vad vízimadár eredetű vírusok közül az I. genotípusúakat főként a Távolság-Keleten izolálták, bár néhány törzs Európából származik, egyébként (valószínűleg másodlagosan) csirkéből. Egy másik 'sister' leszármazási vonalat egyetlen kanadai (CA) törzs képvisel, míg a harmadikban európai és amerikai törzsek egyaránt előfordulnak. Az F-gén részleges szekvencia-analízise utóbbi izolátumok 50% feletti divergenciáját állapította meg. Valójában pontosan be sem lehetett őket sorolni: inkább a recens virulens törzsekkel mutattak közelebbi hasonlóságot. Most meghatároztuk egy ilyen törzs több génjének szekvenciáját, és a viszonylag konzervatívabb nukleoprotein (NP) gén vizsgálata alapján kiderült, hogy ez is I. genotípus egyik sister-csoportja, közel a filogenetikai fa alapjához, de még ennek a génnek is példátlanul nagy a divergenciája. Azt, hogy ez a vírus is az NDV törzsek ősbibb ill. régi csoportjához (I. – IV. genotípusok) tartozik, megerősíti annak a 6 nukleotidból (nt) álló beékelődésnek a hiánya, ami a 'modern' (az 1950-es évek után felbukkant V. – VIII. genotípusú) NDV törzsekben fordul csak elő az NP gén 5'-végi nem kódoló szakaszán. Ennek következtében a régi törzsek genomja 15 186 nt-ből áll, míg az újabbaké 15 192 nt hosszú. További szerkezeti eltéréseket is találtunk, de hogy ezeknek van-e és milyen biológiai következménye, az még további vizsgálatok tárgya.

VÁCZY KÁLMÁN Z.¹, KARAFFA LEVENTE², KÖVICS GYÖRGY³, SÁNDOR ERZSÉBET³

Az egri borvidéken szürkerothadást okozó *Botrytis cinerea* populációk változékonyságának vizsgálata

¹FVM Szőlészeti és Borászati Kutatóintézete, Eger; ²DE TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék; ³DE ATC Növényvédelmi Tanszék, Debrecen

A *Botryotinia fuckeliana* (anamorf: *Botrytis cinerea*) egy haploid, heterotallikus, az Ascomycota törzsbe tartozó fonalas gomba. Nagyszámú (eddig bizonyítottan 235) gazdanövényt képes megtámadni, és rajtuk a szürkerothadás nevű betegséget kiváltani. A zöldségfélék és bogyós gyümölcsűek károsítása mellett szőlészeti kártétele a legjelentősebb. A termelők különböző fungicidek alkalmazásával próbálnak védekezni a szürkerothadást okozó *B. cinerea* ellen, de egyre gyakrabban jelennek meg a különböző fungicidekkel szemben rezisztens törzsek. A *B. cinerea* esetében a sikeres védekezést megnehezíti, hogy egyrészt nagyon variábilis gombáról van szó, másrészt a *B. cinerea* populációk struktúrájáról nincsenek megfelelő ismereteink.

A növénypatogén gomba populációk legfőbb jellemzőinek megismerése elengedhetetlen a hatékony és gazdaságos védekezés kialakításához. A gomba populációk genetikai variabilitásának mértéke, a

populáció nagysága, a szexuális szaporodás megléte, vagy hiánya, a génáramlás mértéke megmutatja, várhatóan mennyi ideig tartható fenn egy adott fungiciddal vagy növényi rezisztencia génnel hatékony védekezés a betegséggel szemben. A gombapopulációk genetikai jellemzéséhez a molekuláris biológiai módszerekkel (pl.: PCR-PFLP, szekvencia analízis) kapott eredmények biztosítanak megfelelő adatokat. Magyarország egyetlen borvidékén sem végeztek eddig hasonló jellegű vizsgálatokat, így hazai vonatkozásban hiánypótló munkára vállalkozunk.

Az elmúlt évben az Egri Borvidék különböző területeiről közel ötven, tiszta, egyspórás *B. cinerea* izolátumot sikerült begyűjteni fertőzött bogyókról. A fenotípusos tulajdonságok közül vizsgáltuk az izolátumok fungicidekkel szembeni rezisztenciáját, és a törzsek „fitnessét”. Az ITS1 és ITS2 szakaszt is tartalmazó riboszómális DNS egy körülbelül 600 bázispár nagyságú részének, illetve az ATP/ADP transzferáz felszaporított szakaszának RFLP analízisével pedig a genotípusbeli különbségeket vizsgáltuk. Eredményeink alapján az izolátumok nagy változékonysággal bírnak.

Kutatásainkat az FVM 33013/2003 pályázatából fedeztük.

VARECZA ZOLTÁN¹, EMRI TAMÁS¹, MOLNÁR ZSOLT¹, PUSZTAHELYI TÜNDE¹, PÓCSI ISTVÁN¹

Élesztőszerű sejtek képződése és glutation metabolizmus *Penicillium chrysogenum* és *Aspergillus nidulans* gombákban

¹DE TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

A gombákban történő morfológiai változásokat már behatóan tanulmányozták. A fonalas↔élesztő átmenetről kiderült, hogy mind patogén törzseknél mind ipari alkalmazásokban nagy jelentőséggel bír. Itt a különböző fonalas gombatörzsekben képződő élesztőszerű sejtek képződését tanulmányozzuk. Leírjuk az élesztőszerű sejtek és képződésük között lévő különbségeket *Penicillium chrysogenum* és *Aspergillus nidulans* vad és ipari törzseinél.

P. chrysogenum ipari törzs fonalas morfológiát mutat növekedő tenyészetekben, de a glükóz elfogyása után egy- és ketesejtes, élesztőszerű sejtek dominálnak a süllyesztett tenyészetekben. A *nidulans*-ban a rövid hifadarabok lényegesen nem különböznek a hifáktól és morfológiájuk soha sem olyan jellemző, mint a *P. chrysogenum* NCAIM00237 törzsnél megfigyeltük. Több különböző faj és törzs vizsgálata alapján (*A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. pinophyllum*) azt találtuk, hogy az *A. nidulans* típusú rövid hifafragmentek általánosan jellemzőek az összes vizsgált *P. chrysogenum* és *A. nidulans* törzsrre, míg a *P. chrysogenum* NCAIM00237 típusú élesztőszerű sejtek csak bizonyos ipari törzsekben fordultak elő (*P. chrysogenum* NCAIM00237 and ATCC28089).

Régóta sejtik, hogy a redukált és oxidált glutaion (GSH/GSSG) létfontosságú szerepet tölt be a mikroorganizmusok és ezen belül a gombák több fontos metabolikus folyamatában. Egy hipotézisből kiindulva tanulmányoztuk, vajon van-e kapcsolat a GSH metabolizmus és az élesztőszerű sejtek képződése között *P. chrysogenum*-ban. Változtatva a tápközeg szerves nitrogéntartalmát sikerült megváltoztatni a GSH metabolizmust és morfológiai változásokat előidézni *P. chrysogenum* ATCC28089 törzsben. Szerves nitrogénforrásként csak élesztőkivonatot tartalmazó táptalajon ez a törzs élesztőszerű sejteket képez, míg élesztőkivonatot és peptont (magas N-tartalom) tartalmazó táptalajon megőrzi fonalas morfológiáját és csak néhány rövid hifatöredéket képez. A GSH metabolizmus szintén megváltozott ezekben a tenyészetekben, de mindig jó korrelációt mutatott a morfológiai változásokkal. A sejtek specifikus γ GT aktivitása sokkal magasabb volt magas N-tartalmú tápközegben, mint alacsony N-tartalmúban és ebből következően a hifák GSH tartalma is gyorsabban csökkent.

NCAIM00237 törzsben a GSH szintek mindig lassan csökkentek és élesztőszerű sejtek mindig képződtek mind magas mind alacsony N-tartalmú tápközegben, ezzel szemben vad típusú *P. chrysogenum* és *A. nidulans* FGSC26 törzsekben a GSH szintek jelentősen csökkentek és mindkét tápközegben rövid hifatöredékek képződése mellett a morfológia fonalas maradt.

Adataink alapján feltételezzük, hogy csak a bizonyos ipari *P. chrysogenum* törzsekben megfigyelt élesztőszerű morfológia egyenes következménye a megváltozott GSH metabolizmusnak. Ezen jelentős adataink alátámasztják a hipotézist, mely szerint van kapcsolat az intracelluláris GSH szintek és a morfológiai átmenetek között. Mivel élesztőszerű sejtek képződését csak bizonyos ipari *P. chrysogenum* törzsekben figyeltünk meg lehetséges, hogy ez a jelenség az ipari törzsfejlesztés következménye.

VARECZA ZOLTÁN¹, EMRI TAMÁS¹, PÓCSI ISTVÁN¹

A NADPH termelés új aspektusa öregedő *Penicillium chrysogenum*-ban

¹DE TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

Az élő sejtek számára legkönnyebben elérhető redukáló erő a NADPH, mely több meglehetősen fontos anabolikus folyamatban, így a zsírsav-, aminosav- és dezoxiribonukleotid szintézisben fontos szerepet játszik gombák esetében is. A redukáló erő ezen formája széles körben használt az intracelluláris redox környezet fenntartásában, véd a reaktív oxigénformákkal szemben és ebből következően, befolyásolja az öregedést és az aszexuális fejlődést is. A NADPH-hoz fűződő széles körű és fontos metabolikus funkciók indítottak bennünket arra, hogy tanulmányozzuk termelődését a pentóz-foszfát út (PPP), és egy alternatív NADP⁺-dependens izocitrát dehidrogenáz által. Kísérleteinkben *Penicillium chrysogenum* süllyesztett tenyészetét vizsgáltuk különböző környezeti feltételek között.

Glükóz jelenlétében a NADPH fő forrása a részleteiben is tanulmányozott oxidatív pentóz-foszfát útvonal, amely a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6PD) és 6-foszfoglükonát dehidrogenáz (6PGD) egymást követő reakcióit foglalja magában. Különböző szénforrásokat használva a tápközegben a *P. chrysogenum* sokkal gyorsabban nőtt glükózon vagy fruktózon, mint laktózon. Ezért nem meglepő, hogy mindhárom vizsgált NADPH termelő enzim magasabb specifikus aktivitást mutatott glükózon és fruktózon, mint laktózon. A nitrát- és szulfát asszimiláció az arabinóz felhasználással együtt jól ismert NADPH függő folyamatok *P. chrysogenum*-ban. Amikor 2% arabinózt, illetve 0.35% NaNO₃-ot használtunk egyedüli szén és nitrogénforrásként, a G6PD és 6PGD aktivitásokban mért növekedés egyértelműen bizonyította a PPP út fontosságát ezekben a metabolikus folyamatokban. A specifikus NADP⁺-ID aktivitásra nem voltak hatással a szén és nitrogénforrásokban történő változások. A zsírsav acetyl-CoA-k hatékony *in vivo* gátlószerei mind a PPP dehidrogenázoknak mind a NADP⁺-ID-nek, amely közvetett bizonyítékaul szolgál ezen enzimek lipidszintézisben játszott szerepének. Más eukariótákhoz hasonlóan, palmitoyl-CoA hatékonyan gátolta mind a G6PD-t mind a NADP⁺-ID-t *P. chrysogenum*-ban, míg a 6PGD meglehetősen rezisztensnek mutatkozott ezzel a hosszú láncú zsírsav-CoA-val szemben.

Míthogy a NADPH feed back gátló hatása a vizsgált dehidrogenázokra arányaiban magasabb volt, mint a NADP⁺-ID-re, levonhatjuk a következtetést, miszerint a fiziológiai szempontból fontos magas NADPH/NADP⁺ aránynál a NADP⁺-ID hatékonyabban működik mint a PPP enzimek.

Hosszú idő óta az oxidatív PPP-t tartották a NADPH termelés legfőbb útvonalának. Ezzel ellentétben a mi eredményeink ékesen bizonyítják, hogy a NADP⁺-ID, amely ugyan növekedő tenyészetekben csak kis szerephez jut, a legfontosabb NADPH termelő dehidrogenázzá lép elő autolizáló és kriptikus növekedést mutató *P. chrysogenum* sejtekben. Figyelembe véve a NADPH fontos biokémiai funkcióit és NADP⁺-ID általi termelődését ki kell hangsúlyoznunk, hogy ez az enzim nagy hatással lehet sok, kedvezőtlen környezeti hatásra beinduló NADPH függő fiziológiai folyamatra is, mint például a szénlimitáltság.

VARGA ERZSÉBET, KISKÓ GABRIELLA, *MARÁZ ANNA

Króm és réz bioszorpciója és reszorpciója gombasejteknél

¹Orvosi és Gyógyszerésztudományi Egyetem, Marosvásárhely, Romania, ²BCE ÉTK Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék, Budapest

A mikroorganizmusok többségére jellemző, hogy sejtfalukhoz kötöten (extracellulárisan) vagy a sejten belül (intracellulárisan) különböző mennyiségben képesek a fémeket, köztük a nehézfémeket is megkötni, akkumulálni. Ennek első lépése az adszorpció, amely a sejtfal vagy a sejtfalon kívüli polimer molekulák segítségével történik és többnyire ionos kötést jelent. A tarnszeptált nehézfémek oldottan vagy szerves molekulákhoz kötöten a sejten belül feldúsulhatnak, de egy részük ki is válhat a citoplazmában vagy a vakuólumban. A különböző gombafajok különböző mennyiségben és mechanizmussal képesek sokféle nehézfém megkötni és akkumulálni, amelyben szerepet játszhatnak különböző cheláló vegyületek (pl. metallothionin, fitochelatin) is. A nehézfémek bizonyos koncentráció felett a

gombákra nézve is toxikusak, a metabolizmustól független akkumuláció azonban még az inaktiválást követően is továbbmegy. Kísérleteink során különböző Ascomycota és Bazidiomycota gombafajok (*Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Geotrichum candidum* és *Penicillium expansum*) króm(VI) és réz(II) bioszorpció és akkumulációs képességét vizsgáltuk mind élő, mind pedig hővel inaktivált sejtek esetében. A gomba biomassza előállítás után vizsgáltuk a nehézfém megkötés hatékonyságát élő és szárított sejteknél úgy, hogy a sejtuszuspenziókhöz a nehézfémek sóoldatait különböző koncentrációkban (0,2; 2 és 20 mM-os K_2CrO_4 , $CuSO_4$) adagoltuk és megfelelő inkubációs körülmények után a sejtek felülúszóiban ICP-vel mértük a szabad fémtartalmat. A sejtek által megkötött fémtartalmat az eredeti oldat fémtartalmához viszonyítva, %-ban határoztuk meg. Eredményeink szerint a megkötött fémek aránya csaknem független volt az oldat koncentrációjától. A Cr(VI) akkumulációban nem találtunk lényeges különbséget a vizsgált fajok között, az élő sejtek azonban jobban akkumulálták a krómot, mint a szárítottak. Mind az élő, mind pedig a szárított sejtek esetében 50 % feletti akkumuláció volt észlelhető. A Cu(II) akkumulációban hasonló tendenciát tapasztaltunk, itt azonban nagyobb különbség mutatkozott a fajok között, de mindegyik elérte az 50 % feletti akkumulációt. Sejt szárazanyagra vonatkoztatva az akkumulált nehézfémeket a következő eredményeket kaptuk: Faj Cr(VI) mg/g szárazanyag Cu(II) mg/g szárazanyag. Élő Szárított *S. cerevisiae* 21,04 13,90 14,90 16,40 *Rh. mucilaginosa* 21,74 21,74 19,58 18,03 *G. candidum* 20,53 15,20 19,20 12,63 *P. expansum* 34,45 28,60 34,62 33,34. Az élő gombasejtek esetében frakcionált kivonással meghatároztuk az egyes fémionok sejtfalhoz kötött és intracelluláris eloszlását a citoplazmában, a vakuólumban és a sejt kompartmentekben White és Gadd (J. Gen. Microbiol. 133, 727-737, 1987) módszere szerint. Az élesztő biomassza által megkötött nehézfémek deszorpcióját híg ásványi savakkal történő eluálás mellett szerves komplexképző és karbonát vegyületeket alkalmazásával vizsgáltuk. A kutatómunkát Varga Erzsébet számára a MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíjjal támogatta.