

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Különböző *Mycoplasma gallisepticum* törzsek összehasonlító vizsgálata több, döntően PCR alapú molekuláris biológiai módszer segítségével

Doktori értekezés

Készítette:

Bíró Judit

Budapest
2006

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....
Prof. Dr. Stipkovits László, állatorvos-tudományok doktora
Magyar Tudományos Akadémia
Állatorvos-tudományi Kutatóintézete

Dr. Varga János, akadémikus
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Dr. Glávits Róbert, állatorvos-tudományok kandidátusa
Országos Állategészségügyi Intézet
Szövettani Osztály

Készült 8 példányban. Ez apéldány.

.....
Bíró Judit

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. ÖSSZEFOGLALÁS	6
3. BEVEZETÉS	7
4. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ	10
4.1. A MYCOPLASMÁK ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE ÉS RENDSZERE.....	10
4.2. A MG OKOZTA BETEGSÉGEK.....	11
4.2.1 A MG fertőzés epidemiológiája.....	11
4.2.2 A MG fertőzöttség következtében kialakuló klinikai tünetek.....	11
4.2.3. A MG fertőzöttséget jelző patológiai elváltozások.....	12
4.2.4. A MG fertőzöttség diagnosztikája.....	12
4.3. A MG OKOZTA FERTŐZÖTTSG MEGELŐZÉSE ÉS A BETEGSÉG KEZELÉSÉNEK MÓDJAI.....	17
4.4. A MG GENOMJÁNAK JELLEMZŐI.....	18
5. ANYAG ÉS MÓDSZER	22
5.1. A MYCOPLASMA-TÖRZSEK.....	22
5.2. A PCR SORÁN VIZSGÁLT GÉNEK.....	23
5.3. MYCOPLASMA TENYÉSZTÉS.....	23
5.4. DNS KIVONÁS.....	24
5.5. A RAPD PCR.....	24
5.6. A GENOMON VÉGZETT RAPD PCR REAKCIÓK RÉSZLETES LEÍRÁSA.....	25
5.7. AZ EGYES GÉNSZAKASZOKRA SPECIFIKUS PCR REAKCIÓK, VALAMINT AZ RFLP ANALÍZIS.....	26
5.8. AZ EGYES GÉNSZAKASZOKRA SPECIFIKUS PCR REAKCIÓK ÉS AZ RFLP SORÁN HASZNÁLT ENZIMEK RÉSZLETES LEÍRÁSA.....	26
5.9. SZEKVENCIA ANALÍZIS.....	32
5.10. STATISZTIKAI ELEMZÉSEK.....	33
6. EREDMÉNYEK	34
6.1. A GENOMON VÉGZETT RAPD PCR REAKCIÓK EREDMÉNYEI.....	34
6.2. AZ EGYES GÉNSZAKASZOKRA SPECIFIKUS PCR REAKCIÓK ÉS AZ RFLP EREDMÉNYEI.....	36
6.3. A SZEKVENCIA ANALÍZIS EREDMÉNYEI.....	53
6.4. STATISZTIKAI EREDMÉNYEK.....	63
7. MEGBESZÉLÉS	65
7.1. A GENOMON VÉGZETT RAPD PCR REAKCIÓK EREDMÉNYEINEK MEGBESZÉLÉSE.....	65
7.2. AZ EGYES GÉNSZAKASZOKRA SPECIFIKUS PCR REAKCIÓK ÉS AZ RFLP EREDMÉNYEINEK MEGBESZÉLÉSE.....	65
8. KÖVETKEZTETÉSEK	69
8.1. KÖVETKEZTETÉSEK A GENOMON VÉGZETT RAPD PCR REAKCIÓK ALAPJÁN.....	69
8.2. KÖVETKEZTETÉSEK AZ EGYES GÉNSZAKASZOKRA SPECIFIKUS PCR REAKCIÓK ÉS AZ RFLP ALAPJÁN.....	70
8.2.1. Az eredmények alapján tett módszertani javaslatok.....	79
8.3. KÖVETKEZTETÉSEK A STATISZTIKAI EREDMÉNYEK ALAPJÁN.....	81
9. ÚJ EREDMÉNYEK ÉS HASZNÁLHATÓSÁGUK	82
10. IRODALOMJEGYZÉK	83
11. PUBLIKÁCIÓS LISTA	102
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	104

1. Rövidítések jegyzéke

bp:	Bázispár
CFU:	Colony forming unit, telepformáló egység
<i>crmA</i> :	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> cytoadhesin-related molecule A, citadhezin-rokon molekula A
<i>crmB</i> :	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> cytoadhesin-related molecule B, citadhezin-rokon molekula B
<i>crmC</i> :	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> cytoadhesin-related molecule C, citadhezin-rokon molekula C
EDTA:	Etilén-diamin-tetra-ecetsav
ELISA:	Enzyme linked immunsorbent assay
<i>gapA</i> :	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> citadhezin A
HAG:	Hemagglutináció-gátlás
<i>LP</i> :	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> lipoprotein
MA:	Mycoplasma agar
MB:	Mycoplasma broth, mycoplasma tápleves
Mbp:	Megabázis pár
MG:	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
<i>mgc2</i> :	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> citadhezin 2
MI:	<i>Mycoplasma imitans</i>
MP:	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
MS:	<i>Mycoplasma synoviae</i>
NMDS:	Non-metric multidimensional scaling, nem-metrikus többdimenziós skálázás
nt:	nukleotid
ORF:	Open reading frame, kódoló szekvencia
PBS:	Phosphate buffer saline
PCR:	Polimerase chain reaction, polimeráz láncreakció
pMGA:	Putative <i>Mycoplasma gallisepticum</i> antigen
<i>PvpA</i> :	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> phase-variable protein A, fázisvariációs fehérje A
RAPD:	Randomly amplified polymorphic DNA, random amplifikált DNS
<i>recA</i> :	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> rekombináza A
RFLP:	Restriction fragment length polymorphism, restrikciós fragment polimorfizmus

SDS-PAGE: Sodium-Dodecyl-Sulphate-Polyacrilamide-Gel-Electrophoresis, nátrium-dodecil-szulfát-polikarilamid-gélelektroforézis

TA: Tárgylemez agglutináció

TNE: TRIS-Nátrium-klorid-EDTA puffer

TRIS: Trisz-(hidroximetil)-amino-metán-hidroklorid

2. Összefoglalás

Munkánk során 12 különböző eredetű, virulenciájú és eltérő biológiai tulajdonsággal rendelkező *Mycoplasma gallisepticum* (MG) törzset, valamint a *M. imitans* 4229 (MI) törzset vizsgáltunk. A különböző országokból származó vad MG törzsek mellett két, napjainkban élő vakcinaként használt törzset (MG F és MG TS-11 vakcina törzsek) is tanulmányoztunk.

A munka első lépéseként a Mycoplasma-törzsek teljes genomját vizsgáltuk két különböző RAPD-PCR rendszer segítségével. Ezzel a módszerrel a vizsgált törzsek között (beleértve a MI-t és a vakcina törzseket is) különbségek mutatkoztak.

A munka további részében az irodalmi adatok alapján a Mycoplasmák patogénitásában feltételezeten szerepet játszó nyolc gén tulajdonságát vizsgáltuk. A vizsgált génekre több PCR módszert fejlesztettünk ki oly módon, hogy a keletkezett ampliconok a vizsgált gén egészét lefedjék. Így egy gén esetében 4-5 szakaszt amplifikáltunk. Az ampliconok mindegyikét emellett restriktív emésztésnek vetettük alá, legalább 2 restriktív enzimet alkalmazva. A gének vizsgálata során továbbá irodalmi primereket is alkalmaztunk.

A gének PCR-RFLP vizsgálatát követően a MI a többi vizsgált MG törzstől egyértelműen megkülönböztethető volt. Ugyanakkor a MG F és TS-11 vakcinatörzsek és a többi vizsgált Mycoplasma-törzs között is jelentkeztek különbségek. Egyes gének változékonyságban mutatkoztak, mint mások, ugyanakkor egy génen belül is található variábilisabb és kevésbé variábilis szekvenciák. A munka eredményeképpen a vizsgált Mycoplasma-törzsek egymástól megkülönböztethetőek voltak.

3. Bevezetés

Nagy problémát okoz a baromfi ágazatban fellépő *Mycoplasma* fertőzöttséggel összefüggésbe hozható gazdasági veszteség. A gyakori mycoplasmás salpingitis következtében csökken a tojástermelés. Ez magában foglalja a tojás minőségének (méretének, tömegének és keltethetőségének) a csökkenését, a tojások fertőzöttségét, az utódállományok gyenge vitalitását, elhullását, rossz takarmányhasznosítását (Pruthi és Karole, 1981; Carpenter és mtsai. 1981; Mohammed és mtsai. 1987; Ley és Yoder, 1997; Kleven, 1998b; Levisohn és Kleven, 2000). A fertőzöttség terjedésének oka a baromfiállományok kifogásolt tartási körülményei, a járványtani védekezés hiányossága, valamint különféle újabb variáns törzsek elterjedése. Ezekben a törzsekben bekövetkezett antigén szerkezeti változás a szerológiai próbák megbízhatóságát is megkérdőjelezi. A *Mycoplasma gallisepticum* (MG) törzsek felszíni fehérjéinek változékonysága lehetővé teszi a gazda immunválaszának elkerülését (Glew és mtsai. 2000; Gorton and Geary, 1997; Levisohn és mtsai. 1995), az MG törzsek eukarióta sejtekben való túlélését és az antimikrobiális szerek hatékonyságának csökkenését (Winner és mtsai. 2000).

Egyes országokban terjedőben vannak a variáns törzsek, de emellett az élő vakcinák alkalmazásával történő védekezési eljárás is növekszik. A jövőben várható, hogy ilyen vakcina törzsek részben illegálisan, részben pedig importált tenyészállatokkal Magyarországra is eljutnak. Így a fent említett törzseknek elkülönítése járványtani nyomozás és a MG fertőzöttség elleni védekezésben szükségessé válik.

A MG és több más *Mycoplasma* faj mellett a baromfiállományokból MI is izolálható (Bradbury és mtsai. 1993). A MI fenotipikus tulajdonságaiban hasonló a MG-hoz (Bradbury és mtsai. 1993), azonban molekuláris tulajdonságai alapján különböznek egymástól (Harasawa és mtsai. 2004). Ugyanakkor a két faj között szerológiai keresztreakciókat tapasztalhatunk (Bradbury és mtsai. 1993), ami diagnosztikai nehézséget okozhat. A MG mellett a MI is patogénnek bizonyult (Abdul-Wahab és mtsai. 1996).

A *Mycoplasma* fertőzöttség diagnosztikájában az izolálás mellett a fejlődő molekuláris biológiai módszerek is segítséget nyújtanak. A kutatások egyik irányvonala a mycoplasmák felszíni fehérjéinek vizsgálata felé vezetett (Bencina és mtsai. 1994; Razin és mtsai. 1998). Az utóbbi években számos MG specifikus felszíni fehérjét azonosítottak és írtak le (Boguslavsky és mtsai. 2000; Garcia és mtsai. 1994; Levisohn és mtsai. 1995; Markham és mtsai. 1998).

A kutatások másik iránya a MG törzsek DNS mintázaton alapuló megkülönböztetését jelenti. Az egyik legérzékenyebb módszer a RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA, Charlton és mtsai. 1999a, b; Fan és mtsai. 1995; Geary és mtsai. 1994). Ezt a módszert sikeresen alkalmazták különböző variáns- és vakcina törzsek azonosítására és elkülönítésére (Ley és mtsai. 1997a), valamint elsősorban epidemiológiai tanulmányok céljából (Ley és mtsai. 1997b). A módszer egyik előnye, hogy a vizsgálni kívánt DNS szekvenciáról nem szükséges előzetes információval rendelkezünk. Emellett a patogenitásban részt vevő fehérjéket kódoló génszakaszok PCR-rel való vizsgálata során nyert PCR termékek eltérő molekulatömege alkalmas a különböző csirke- és pulykaállományokból izolált virulens és kevésbé virulens törzsek elkülönítésére (egymással, valamint vakcina törzsekkel való összehasonlítására) (Kleven és mtsai. 1990). A MG törzsek közti különbségtétel hasznos lehet a fertőzöttség járványtani nyomonkövetésében is.

Mindezek figyelembevételével munkám célja:

1. A különböző biológiai tulajdonságokkal rendelkező MI és MG törzsek RAPD-PCR-rel való összehasonlítása.
2. A különböző biológiai tulajdonságokkal rendelkező MI és MG törzsek egyes génszakaszainak PCR-RFLP összehasonlítása.
3. Az egyes génszakaszokra tervezett PCR-ek során keletkezett amplikonok szekvenálása, valamint a szekvenciák összehasonlítása különböző MG törzsek esetében.
4. Az MI és MG törzsek összehasonlítása a RAPD PCR, valamint a különböző génszakaszokra tervezett PCR-RFLP eredmények alapján többváltozós statisztikai módszerek segítségével.

4. Irodalmi összefoglaló

A mycoplasmák (*Mollicutes* osztály) a parazita baktériumok széles spektrumát képviselik. Tagjai a legkisebb önállóan szaporodni képes mikroorganizmusok, melyek a fennmaradásukhoz szükséges minimális génszámmal rendelkeznek. A *Mycoplasma* genom redukciója maga után vonta a sejtfal elvesztését és a bioszintetikus folyamatok számát is limitálta. Ezért nem csoda, hogy a mycoplasmák modellként szolgáltak az életfolyamatokhoz és a sejt reprodukcióhoz feltétlenül szükséges gének és molekuláris folyamatok vizsgálata során (Morowitz, 1984).

4.1. A Mycoplasmák általános jellemzése és rendszere

A *Mollicutes* osztály tagjait a kicsi genom méret (0,58 - 2,2 Mbp), a genom alacsony G+C aránya (23-40 mol%) és a sejtfal állandó hiánya jellemzi. Ezen kívül a mycoplasmákra általánosan jellemző, hogy triptofánjukat az UGA triplet kódolja (Hnatow és mtsai. 1998), stop kodonjaik között pedig az általános kóddal ellentétben nem szerepel a TGA triplet. Emellett az osztály tagjaira jellemző, hogy membránjukba koleszterint építenek (Razin, 1983).

A *Mollicutes* osztálynak jelenleg körülbelül 200 faja ismert. A prokarióta taxonómia szerint a *Mollicutes* osztály a *Firmicutes* törzshöz tartozik. A *Mollicutes* osztályba a *Mycoplasmatales*, az *Entomoplasmatales*, az *Acholeplasmatales* és az *Anaeroplasmatales* rendek tartoznak. A *Mycoplasmatales* rendbe csupán a *Mycoplasmataceae* családot sorolták a *Mycoplasma* és az *Ureaplasma* genussal. A *Mycoplasma* genusba jelenleg 107, az *Ureaplasma* genusba pedig 7 species, illetve subspecies tartozik (Johansson és Petterson, 2002).

A *Mollicutes* osztály 200 tagja közül viszonylag kevés számú, főként a *Mycoplasma* genusba tartozó, állatokra patogén fajt ismerünk. Amellett, hogy a patogén mycoplasmák betegségeket okoznak, fontos szerepet játszanak például az állatállományok testtömegének csökkenésében klinikai betegség megjelenése nélkül is. A nem patogén mycoplasmák hasonló antigén szerkezettel rendelkezhetnek, mint a patogén törzsek, így az esetlegesen fellépő szerológiai keresztreakciók miatt sokszor diagnosztikai nehézséget okoznak (Frey, 2002).

4.2. A MG okozta betegségek

4.2.1 A MG fertőzés epidemiológiája

A MG okozta fertőzés leggyakrabban csirkékben és pulykákban jelentkezik, de a MG izolálható kacsákból, libákból, galambokból, fácánokból, fürjekből, házi pinytekből és egyéb vadmadarokból is (Jordan, 1979; Buntz és mtsai. 1986; Yoder, 1991; Cookson és Shivaprasad, 1994; Luttrell és mtsai. 1996; McMartin és mtsai. 1996). Ezen kívül ezek az állatfajok más mycoplasmákkal is fertőződhetnek (Jordan, 1979; Jordan és mtsai. 1982). A fejlett országok baromfiállományának 5-30%-a, míg a fejlődő országok állományának 60-70%-a MG-vel fertőzött.

A MG fertőzöttség direkt kontaktussal, vagy a levegőben levő porral terjed. A transzmisszió a fertőzöttség akut fázisában a legkifejezettebb (Soeripto és mtsai. 1989b; Yoder, 1991; Gibbs és mtsai. 1994). Mivel a fertőzöttség hosszú időn keresztül perzisztál, ezért a fertőzött állományok újabb fertőzés forrásai lehetnek. A MG a környezetben 11-14 napig életképes, de ez nagymértékben függ a külső környezet tulajdonságaitól.

A MG a légzőszervek kolonizálását követően a belső szervekben is elterjedhet, például a lépben, májban, vesében és ivarszervekben. Ily módon a kialakuló tojások is fertőzöttek lehetnek. A fejlődő embriók egy része elpusztul, a másik része viszont kikelve újabb fertőző forrásként szolgál (Levisohn és Kleven, 2000).

A fertőzés megelőzésére több élő és elölt vakcinát dolgoztak ki (Whithear, 1996; Kleven, 1998a).

4.2.2 A MG fertőzöttség következtében kialakuló klinikai tünetek

Különböző országokból és állatfajokból származó nagyszámú minta vizsgálata során kiderült, hogy a MG fertőzöttség változatos képet mutat. A MG csirkékben krónikus légzőszervi betegséget (CRD, chronic respiratory disease), pulykákban pedig szinuszgyulladást okoz, melyet köhögés, orrfolyás, nehézlégzés, könnyezés, szaruhártya- és kötőhártya-gyulladás, ritkán sántaság, valamint idegrendszeri tünetek kísérnek (Nunoya és mtsai. 1995). Vadmadarakban a MG fertőzöttséget kötőhártya-gyulladás és légzsákgyulladás jelzi (Cookson és Shivaprasad 1994; Luttrell és mtsai. 1996; McMartin és mtsai. 1996; Jordan, 1979; Yoge

és mtsai. 1988, 1989; Soeripto és mtsai. 1989b; Yoder, 1991). Egyes törzsek csupán a légzőszerveket kolonizálják, mások sikeresen megtelepednek a többi belső szervben is, esetleg bizonyos törzsek fertőzését követően a szerológiai válasz csak hosszú idő (16 hét) múlva jelenik meg. A MG törzsek változatossága miatt a kialakuló betegség lehet enyhe vagy súlyos, a betegség kialakulhat lassan vagy viszonylag gyorsan is. Egyes esetekben a diagnosztizálás egyszerűbb, míg más esetekben nagyobb körültekintést igényel (Yoder, 1986, 1991; Kleven és mtsai. 1988; Yogev és mtsai. 1988, 1989, 1994; Ley és mtsai. 1993).

A MG fertőzöttségre utaló nem specifikus tünet a csökkenő tojástermelés, a tojások keltethetőségének, és a testtömeg gyarapodásának csökkenése, a fajlagos takarmányfelhasználás emelkedése. A MG-vel fertőzött állatok fokozottabban érzékenyek a Mycoplasma fertőzéssel egyidőben jelentkező különböző vírusos (New Castle disease virus = NDV, infectious bronchitis virus = IBV, infectious bursal disease virus = IBDV), valamint baktériumos (*Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*) fertőzések iránt.

4.2.3. A MG fertőzöttséget jelző patológiai elváltozások

A MG fertőzöttség következtében a légcső nyálkahártyája megvastagodik, a szinuszokban, a légcsőben, és légzsákokban váladék képződik, a légzsákok fala megvastagodik. Ritkábban szívburok-gyulladás és a máj körüli kötőszövet gyulladása is megfigyelhető. Esetenként az ízületekben folyadék gyülemlik fel, vagy az ivarszervekben sejtes beszűrődés figyelhető meg.

4.2.4. A MG fertőzöttség diagnosztikája

A klinikai tünetek megjelenése mellett a MG fertőzöttség laboratóriumi körülmények között azonosítható. Ebben segítségül szolgálnak a MG izolálás és az izolátumok azonosítása, valamint a különböző szerológiai-, és DNS alapú próbák.

4.2.4.1. Mycoplasma tenyésztés és azonosítás

A MG a könnyen tenyészthető mycoplasmák közé tartozik, tenyésztése mégis körültekintést igényel. Az izolátumok tenyésztetők B táptalajban (Erno és Stipkovits, 1973a, b), amely DNS-t, ló- illetve sertéssavót, glükózt, fenolvöröst és baktériumok növekedését gátló anyagokat (penicillin származékot, thallium-acetátot) tartalmaz. Egy hét inkubációt követően

a szilárd táptalajon (MA) a telepek is megjelennek. A telepek azonosítását immunfluoreszcens eljárással (Bradbury, 1998) anti MG hiperimmun savó segítségével lehet elvégezni.

4.2.4.2. *Immunreakciókon alapuló tesztek a MG fertőzés kimutatására*

1. *Tárgylemez agglutináció (TA)*

A TA során a vérsavóban az IgM jelenléte vizsgálható (Levisohn és Kleven, 2000). A teszt a fertőzést követő 1-2 hét múlva használható. A teszt eredményét befolyásolja a vizsgált savó minősége, a fertőzésben szerepet játszó MG törzs (Avakian és Kleven, 1990b) és a MG mellett esetlegesen előforduló baktériumos (*Staphylococcus aureus* vagy *Streptococcus faecalis*) fertőzés (Thornton, 1973; Kleven, 1975; Ross és mtsai. 1990). A különböző vírusok és baktériumok ellen használt vakcinák alkalmazása is befolyásolhatja a TA eredményét, mivel hamis pozitív reakciót eredményezhet (Avakian és mtsai. 1988; Yoder, 1989; Avakian és Kleven, 1990a, b; Ross és mtsai. 1990).

2. *Hemagglutináció gátlási próba (HAG)*

A HAG próba a MG hemagglutinációs képességén alapszik. A próba során a vérsavóban levő IgG ellenanyagok detektálhatók (Roberts és Olesuk, 1967) oly módon, hogy a vizsgált savóhoz MG tenyészetet és vörösvértest szuszpenziót adva a savóban levő IgG ellenanyag a Mycoplasma sejtekkel immunkomplexet képez, így a Mycoplasma nem agglutinálja a vörösvérsejteket. Az IgG molekulák a természetes fertőzést követő 2.-3. héten már megjelennek, maximális szintjüket az 5.-6. héten érik el (Chhabra és Goel, 1981). A teszt nem alkalmas a különböző MG törzsek által indukált szerológiai válasz megkülönböztetésére (Czifra és mtsai. 1995).

3. *ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)*

Az MG fertőzöttség (általában IgG ellenanyagok) detektálásra széleskörben alkalmaznak különféle ELISA teszteket (Kempf és Gesbert, 1998; May és Branton, 1997; Talkington és mtsai. 1985; Thomas és Sharp, 1998). Az ELISA teszt előnye, hogy könnyen alkalmazható, az eljárás automatizálható és a teszt nagyfokú érzékenységgel bír (Ewing és mtsai. 1996; May és Branton, 1997; Kempf és Gesbert, 1998).

Az indirekt ELISA során az IgG ellenanyag és az antigén kötődését az ellenanyagra specifikus jelölt anti-egér konjugátummal tesszük láthatóvá. A teszt érzékenyebb, mint a HAG, viszont nem specifikus reakciót is eredményezhet.

A blokkoló ELISA alkalmazásakor a vizsgált savóban levő IgG ellenanyagok az antigénhez kapcsolódnak, így a konjugátumban levő, szintén az adott antigénre specifikus jelölt ellenanyagok már nem alkotnak antigén-ellenanyag komplexet. A módszer érzékenysége az indirekt ELISA-éhoz hasonló (Kempf és mtsai. 1994), a HAG próbánál viszont sokkal érzékenyebb (Czifra és mtsai. 1993a, b). A módszer további előnye, hogy a teszt során használt monoklonális ellenanyag a MG több törzsére tesztelt, MG specifikus antigénnel (a MG p56 antigén, Czifra és mtsai. 1993a) alkot immunkomplexet. Mivel ez az antigén több állatfajban is immunogén tulajdonsággal bír, így a teszt pulykák (Kaszanyitzky és mtsai. 1994) és egyéb vadmadarak esetében is alkalmazható MG detektálására. A teszt a MG több törzsét is kimutatja (Czifra és mtsai. 1995).

4. Immunoblot analízis

A teszt során SDS-PAGE gélben szétválasztott MG fehérjéket nitrocellulóz membránra blotolják, majd a vizsgált csirkesavóban levő ellenanyag és a membránon levő antigén reakcióját anti-csirke konjugátummal és szubsztráttal teszik láthatóvá (Ellekany és mtsai. 1997; Sundquist és mtsai. 1996). A módszer előnye, hogy az immundomináns fehérje detektálható, valamint a fehérje mintázat alapján az egyes MG törzsek megkülönböztethetőek (Hwang és mtsai. 1989; Panangala és mtsai. 1992; Elfaki és mtsai. 1993b; Bencina és mtsai. 1994; García és mtsai. 1994; Ben Abdelmoumen és Roy, 1995).

4.2.4.3. DNS alapú diagnosztikai tesztek, a PCR alkalmazhatósága és előnyei

A *Mycoplasma* tenyésztés és az immunológiai módszerek mellett igen elterjedtek a DNS alapú diagnosztikai eljárások is.

A MG detektálására alkalmasak a nukleinsav hibridizációs próbák (Sántha és mtsai. 1987; Stipkovits és mtsai. 1988; Kleven és mtsai. 1988). A direkt filter hibridizáció során a DNS kivonás elvégzése nem szükséges, így a hibridizáció gyorsabbá és gazdaságosabbá válik (Belák és mtsai. 1987; Stipkovits és mtsai. 1988; Belák és mtsai. 1988). Ezen a módszeren kívül a MG a 16S riboszómális RNS génre tervezett, digoxigeninnel jelölt oligonukleotidok segítségével is detektálható (García és mtsai. 1996).

A PCR alkalmazásával a DNS *in vitro* kimutatása válik lehetővé. A módszer lényege, hogy *in vitro* rendszerben összeállított reakcióelegyben a DNS szintéziséért felelős enzim a DNS

minta egy szakaszát specifikusan megsokszorozza (amplifikálja). A reakcióelegy az enzimen és a DNS mintán kívül az enzim működéséhez szükséges ionokat és vegyületeket tartalmazza. A reakció során a DNS templát denaturálódik, majd a denaturálódott DNS szálakhoz a primerek (oligonukleotidok) nukleotid-nukleotid kölcsönhatás révén kapcsolódnak. A primerek kapcsolódását követően az enzim elkészíti az új DNS szakaszt.

A módszer specificitása az alkalmazott primereken alapul. Ezeknek az oligonukleotidoknak a tervezéséhez számos számítógépes program áll rendelkezésre (Oligo 3.0, 4.0, 5.0, PRIMER Primer Designer 2.0 (Scientific & Educational Software)).

A PCR módszerek több változata is ismert. A nested és a seminested PCR reakciókban két primer párt alkalmaznak két egymást követő reakcióban. A nested PCR során az A és a B primerek által amplifikált szakaszt újabb PCR-nek vetik alá úgy, hogy az új primer pár (C és D) által amplifikált szakasz az A és B primerek által felszaporított szakasz közé essen. A seminested PCR során az A és a B primerek által felszaporított szakasz újabb PCR-e során a C primer párja vagy az A, vagy pedig a B primer lesz (Liu és mtsai. 2001; García és mtsai. 2005).

Amennyiben egy PCR elegendően több, különböző génre specifikus primer pár fordul elő, multiplex PCR-ről beszélünk. Mivel a multiplex PCR reakcióelegyében több komponens vesz részt, ezért ezen PCR optimalizációja is nehezebb. Ugyanakkor a multiplex PCR alkalmazásával a diagnosztika költségei jelentősen csökkenthetők.

A RAPD PCR alkalmazása során nem szükséges előzetes ismeretekkel rendelkezni a vizsgálni kívánt szekvenciáról. Több 5'-3' irányban amplifikáló primer egyidejű alkalmazása során a primerek véletlenszerűen kapcsolódnak a minta DNS-hez. A RAPD PCR során használt primerek szekvenciája ezért általában rövidebb, mint a többi PCR esetén. A RAPD PCR eredménye több, különböző méretű amplicon lesz (Fan és mtsai. 1995; Charlton és mtsai. 1999a, b).

A PCR reakciók használatával a MG fertőzöttség gyorsabban mutatható ki, mint a Mycoplasma tenyésztéssel. Ugyanakkor PCR segítségével a Mycoplasma akkor is kimutatható, ha a tenyészet egyéb baktériumokkal fertőzött. A PCR hátránya viszont, hogy a már nem élő Mycoplasma is kimutatja, így amennyiben csupán a PCR esetleges pozitív eredményeire támaszkodunk, a vizsgált állományról hamis képünk alakulhat ki. Ma számos

PCR reakció áll rendelkezésünkre, melyek segítségével a MG gyorsan detektálható (Nascimento és mtsai. 1991, 1993; Marois és mtsai. 2001, 2002; García és mtsai. 2005), de emellett multiplex PCR alkalmazhatósága is ismeretes (Wang és mtsai. 1997).

A MG detektálása mellett a PCR során amplifikálódott DNS szakaszok további vizsgálatával lehetőség nyílik a különböző törzsek fenotipikus tulajdonságai háttérében rejlő genetikai tulajdonságok felderítésére is. Emellett a PCR alapján az egyes törzsek rokonsága is felderíthető. Ezen kérdésekre az RFLP és a direkt szekvenálás adhat választ (García és mtsai. 1995; Kiss és mtsai. 1997; Liu és mtsai. 2001; Pillai és mtsai. 2003; Lysnyansky és mtsai. 2005; Kleven és mtsai. 2004). Az RFLP során a keletkezett amplikont restriktív enzimekkel hasítják. Az enzimek specificitását a hasítani kívánt DNS szekvencia adja. Az enzim csak bizonyos szekvenciákhoz képes kapcsolódni, a kapcsolódást követően pedig optimális hőmérsékleten működésbe lépni (Liu és mtsai. 2001).

Liu és mtsai. (2001) a *pvpA* hemagglutinint kódoló szekvenciát használta referens MG törzsek, valamint MG izolátumok vizsgálatára. A PCR-RFLP alkalmazásával a törzsek között több mintázatot is feltárt. Kleven és mtsai. (2004) ugyanezen szekvencia mellett a *gapA* és az *mgc2* adhezinek kódoló szekvenciákat, valamint a Nascimento és mtsai (1991) által *LP* génnek nevezett régiót is bevonta vizsgálataiba. Emellett Fan és mtsai. (1995), Charlton és mtsai (1999b) és Geary és mtsai. (1994) által kifejlesztett RAPD PCR reakciókat is használta három referens MG törzs, valamint öt, pulykákból izolált MG törzs jellemzésére. A gének szekvenciái alapján több különbséget is megfigyelt. Lysnyansky és mtsai. ugyancsak az *mgc2* gén alapján vizsgált izraeli MG mintákat.

Ezen kívül a MG és a MI elkülönítésére is alkalmaztak különböző PCR reakciókat. Marois és mtsai. (2001) RAPD PCR alkalmazásával több MG és MI törzs jellemzését végezte el. Emellett a két *Mycoplasma*-faj között a 16S rDNS szekvenciájában három nukleotid különbséget találtak (Kempf 1997).

A PCR mellett a MG kvantitatív detektálására valós idejű PCR (real-time PCR) is alkalmazható (Carli és Eyigor 2003). Ugyanakkor az MG és az MI real-time PCR-rel való elkülönítése sikertelennek bizonyult (Mekkes és Feberwee, 2005).

4.3. A MG okozta fertőzöttség megelőzése és a betegség kezelésének módjai

A MG fertőzöttség kezelésére számos lehetőség van. Az antibiotikumok használatakor figyelembe kell venni a betegséget okozó törzs antibiotikum érzékenységét, és csak ezután lehet alkalmazni azt az antibiotikumot, mellyel szemben a törzs magas fokú érzékenységet mutat (Hannan, 2000; Reinhardt és mtsai. 2005). A hús és a tojás emberi fogyasztása miatt ma már az antibiotikumok használatát kerülik. Helyettük különböző élő és elölt vakcinák alkalmazásával igyekeznek a MG fertőzés ellen védekezni.

Élő vakcinák közül az egyik legelterjedtebb az F törzsből készült vakcina (Carpenter és mtsai. 1981; Kleven, 1981). Az F törzs Connecticutból származó, természetes infekciót okozó, csirkékre nem, pulykákra viszont patogén törzs (Rodriguez és Kleven, 1980; Lin és Kleven, 1982). Szintén élő vakcinaként használják az MG TS-11 törzset (Soeripto és mtsai. 1989a; Whithear és mtsai. 1990a, b; Turner és Kleven, 1998). A TS-11 törzs ausztrál virulens törzsből (80083) kémiai mutációval előállított hőérzékeny törzs (TS = termo-sensitive). A TS-11 törzs 34°C-on könnyen, 40°C-on azonban nem tenyészthető, így a csirkékben a felső légutakat kolonizálja, a belső szervekben azonban nem képes megtelepedni. A napjainkban ugyancsak használt MG 6/85 törzsből készült élő vakcinát (Evans és Hafez, 1992) szintén az USA-ban állították elő. A vakcinaként alkalmazott törzsek az állományokban esetlegesen előforduló vad törzsekhez hasonlóan szerológiai választ idézhetnek elő (Whithear, 1996; Bíró, és mtsai. 2005; Collett és mtsai. 2005). Emiatt a vakcina- és a vad törzsek megkülönböztetése szükségessé válik. A fent említett élő vakcinák mellett újabban az MG R magas passzázzsal előállított törzséből nyert újabb élő vakcina hatékonyságát is tesztelték (Papazisi és mtsai. 2002a).

Az elölt vakcinák inaktivált MG sejtszuszpenziót tartalmaznak. Az elölt vakcinákat bőr alá adva, az állat 12 és 20 hetes kora között alkalmazzák (Talkington és Kleven, 1985; Elfaki és mtsai. 1993a).

4.4. A MG genomjának jellemzői

Az elmúlt 10 évben a MG gazdasági szerepe miatt fokozódott iránta a kutatók figyelve. A MG patogenitásában a sejtfelszíni adhezinek (GapA, Mgc2) és a hemagglutininek (pMGA) játszanak szerepet (Goh és mtsai. 1998; Hnatow és mtsai. 1998; Markham és mtsai. 1992; Noormohammadi és mtsai. 2000; Papazisi és mtsai. 2000; Bencina, 2002). A pMGA változékonysága (Glew és mtsai. 1998, 2000) és a citadhezinek variabilitása (Garcia és mtsai, 1994; Athamna és mtsai. 1997; Boguslawsky és mtsai, 2000) az MG számára lehetővé teszi a gazda immunválaszának elkerülését.

A mycoplasmák kicsi genomjuk következtében a genomszekvenálás előterébe kerültek. A MG R törzsének genomja (Papazisi és mtsai. 2003, GenBank szám: AE015450) mellett a *M. genitalium* (Fraser és mtsai. 1995, L43967), a *M. pneumoniae* (Dandekar és mtsai. 2000, U00089), az *Ureaplasma urealyticum* (Glass és mtsai. 2000, AF222894), a *M. penetrans* (Sasaki és mtsai. 2002, BA000026), a *M. pulmonis* (Chambaud és mtsai. 2001, AL445566), a *M. mobile* (Jaffe és mtsai. 2004, AE017308), a *M. mycoides subsp. mycoides* SC (Westberg és mtsai. 2004, BX293980), a *M. capricolum subsp. capricolum* (Glass és mtsai. 2005, CP000123) és a *M. hyopneumoniae* (AE017243), valamint a *M. synoviae* (AE017245) (Vascolenos és mtsai. 2005) genomja is ismert.

A MG R genomja 996422 bázispárból áll, a genom G+C aránya 31 mol%. 742 lehetséges kódoló szekvenciát (ORF) tartalmaz, ezek közül eddig 469 szekvencia funkcióját azonosították. A kódoló szekvenciák átlagos hossza 1206 nukleotid (Papazisi és mtsai. 2003).

A károsodott DNS javításában szerepet játszó gének

A Mycoplasmák DNS javító mechanizmusában számos gén és számos fehérje részt vesz. Az SOS stressz válasz rendszere a DNS károsodás kijavításának alapvető útvonala (Razin és mtsai. 1998). Az SOS stressz válaszban a *recA* gén fontos szerepet játszik. Az általa kódolt fehérje a DNS-t ért károsodás következtében aktiválódik, az aktivált forma pedig más fehérjék aktivációját katalizálja. A *recA* gének az összes mycoplasma fajban megtalálhatóak, és bár a RecA fehérje fontos funkcióval rendelkezik, a fehérjét kódoló gén mégis variabilis. A *recA* génben mutációt szenvedett *Acholeplasma laidlawii* törzs sokkal érzékenyebbnek mutatkozott UV besugárzásra (Dybvig és Woodard, 1992). Ugyanakkor a *Spiroplasma citri* és a *S. melliferum* *recA* génjeinek mutációja révén az UV sugárzásra kevésbé érzékenyek (Marais és mtsai. 1996).

Egy másik utat jelent (BER = base excision repair) a DNS genotoxikus ágensek (például aktív oxigén gyökök) általi károsodások kijavításáért felelős. A rendszer tagjai glikozilázok, melyeket több *Mycoplasma* fajban (*M. genitalium*, *M. pneumoniae*, *M. pulmonis*) az *ung* (uracil-DNS glikoziláz gén), az *fpg* (formamidopirimidin- DNS glikoziláz) vagy a *nfo* (endonukleáz IV) gén kódol (Zou és Dybvig, 2002).

A DNS javító mechanizmusok harmadik útja (NER = nucleotide excision repair) a DNS-t ért nagyobb károsodások kijavításáért felelős. Az *uvrA*, *B* és *C* az excinukleáz A, B és C-t kódolja, az *uvrD* aktivációja során pedig DNS helikáz II fehérje képződik. Több *Mycoplasma* fajban (*M. genitalium*, *M. pneumoniae*, *M. pulmonis*) szerepet tulajdonítanak a *dnaE* és a *lig* géneknek is. Az előbbi DNS polimerázt, az utóbbi DNS ligázt kódol (Zou és Dybvig, 2002).

Virulencia faktorok

Az MG lehetséges virulencia faktorait a fehérje mintázat elemzésével vizsgálták. Eddig 133 membránhoz kötött fehérjét azonosítottak, beleértve a lektin kötő doméneket is (Elgavish és Shaanan, 1997; Loris és mtsai. 1998). Ezek közül 51 lipoprotein és 34 tartozik a VlhA családba. Ez azt jelenti, hogy az MG jelentős számú membrán fehérjével rendelkezik, melyek cukor molekulákat köthetnek meg, és szerepet játszanak a táplálék felvételben vagy a sejtdhézióban. Az MGA_0090 és az MGA_0091 fehérjemolekulák foszfolipid kötő fehérjékkel mutattak rokonságot. Emellett az MGA_0313 és az MGA_0931 fehérjék olyan motívumot tartalmaznak, melyek a *Staphylococcus/ Streptococcus* pirogén exotoxinjához hasonlóak (Papazisi és mtsai. 2003).

A pMGA géncsalád

A mycoplasmák talán leginkább vizsgált géncsaládja a pMGA, vagy más néven a VlhA lipoproteineket kódoló szekvenciák (Baseggio és mtsai. 1996; Liu és mtsai. 1998; Markham és mtsai. 1993, 1999). A MG általában a géncsalád egy tagját expresszálja egy időben (Glew és mtsai. 1995). A géncsalád lehetséges szerepe az antigén variabilitás kialakítása, ahogy azt Glew és munkatársai bemutatták (Glew és mtsai. 2000). A géncsalád 43 génből áll, melyek 5 lokuszon helyezkednek el. Nevüket a lokuszon, illetve a pozíciójukon való elhelyezkedésükről kapták.

PvpA fehérje

A PvpA hemagglutininnak vélt fehérje, mely változatos formában expresszálódik és így a MG törzsek között a fehérjét tekintve változatosság figyelhető meg (Boguslavsky és mtsai. 2000; Liu és mtsai. 2001; Yogev és mtsai. 1994; Rosengarten és Wise, 1990; Winner és mtsai. 2003). A *pvpA* gén elemzése során kiderült, hogy az MG R törzs esetében egy 37 nt hosszúságú szakasz duplikációja figyelhető meg (Boguslavsky és mtsai. 2000).

A MG adhezinjei

A MG genomon belül 5, funkcióját tekintve adhezin-szerű molekulát azonosítottak. Az *mgc2* gén által kódolt fehérje több *Mycoplasma*-fajban megtalálható és fontos szerepet játszik a fajok virulenciájában. A gén egy 32,6 kDa citadhezint kódol, mely a *M. pneumoniae* P30 nevű citadhezinjével 40,9%-ban, a *M. genitalium* P32 nevű fehérjéjével pedig 31,4%-ban mutat hasonlóságot (Hnatow és mtsai. 1998). Ettől a géntől downstream irányban vannak jelen a *gapA*, illetve *crmA* gének. Az MG R törzsből magas passzázsszámmal (164 passzázs) előállított Rhigh törzs nem rendelkezik citadherens tulajdonsággal (Levisohn és mtsai. 1986). Emellett a törzs nem expresszálja a *gapA* és a *crmA* gének által kódolt fehérjéket sem (Troy, 1998). Ugyanakkor Papazisi olyan mutánst állított elő, mely vad típusú *gapA* génnel, valamint mutációt szenvedett *crmA* génnel rendelkezett, viszont a törzs nem nyerte vissza citadherens tulajdonságát (Papazisi és mtsai, 2000). Emellett Papazisi leírt egy citadherens R törzs mutánst (GapA⁻CrmA⁻), mely működő *gapAcrmA* operonnal rendelkezett (Papazisi és mtsai. 2002b). Ezzel bebizonyította, hogy a *gapA* és *crmA* expressziója szükséges a MG citadherenciájához és patogeneziséhez. A MG *gapA* ortológ a *M. pneumoniae* P1 adhezinjét kódoló génnel (Goh és mtsai. 1998). A virulens és avirulens MG R törzsek összehasonlítása során a *gapA* génben kialakuló „frameshift” mutáció következtében GapA⁻ avirulens mutáns alakult ki (Papazisi és mtsai. 2000). A *gapA* által kódolt fehérje aminosav sorrendje 41%-os hasonlóságot mutat a *M. pneumoniae* és a *M. genitalium* ORF6 által kódolt fehérjéjével (Papazisi és mtsai. 2000). Ezek a fehérjék fontos szerepet játszanak a *M. pneumoniae* adhéziójában (Krause és Balish, 2001; Krause és mtsai. 1982; Layh-Schmitt és Harkenthal, 1999; Seto és mtsai. 2001). A *gapAcrmA* operonhoz downstream irányban helyezkednek el a *crmB* és a *crmC* gének, melyek a GapA-val és a CrmA-val homológ fehérjéket kódolnak.

A mycoplasmák felszíni fehérjéiknek köszönhetően megtapadnak a gazda sejt felületén (Razin és mtsai. 1998), de emellett néhány mycoplasma olyan mechanizmusokat fejlesztett ki, melyek segítségével képes a gazda sejtbe jutni. A MG mellett (Winner és mtsai. 2000) a *M. fermentans* (Stadlander és mtsai. 1993), a *M. pneumoniae* (Athamna és mtsai. 1996; Baseman

és mtsai. 1995), a *M. penetrans* (Lo és mtsai. 1993; Giron és mtsai. 1996) és az *M. genitalium* (Jensen és mtsai. 1993) is rendelkezik inváziós képességgel.

A folyamatban mind a gazdasejt felszíni fehérjéi, mind pedig a baktériumok fehérjéi részt vesznek (Chausee és mtsai. 2000; Shaw és Falkow, 1988). A baktériumok részéről a fibronektinnek és a szulfatált poliszacharidoknak fontos szerepe lehet a folyamat kialakulásában (Chausee és mtsai. 2000; Duensing és mtsai. 1999).

A MG virulenciájában központi szerepet játszik az, hogy az MG eukarióta sejteken megtapad, majd a sejtekbe jutva képes ott túlélni, ezáltal a gazda immunválaszával és az antibiotikumokkal szemben védettséget élvez (Winner és mtsai. 2000). A *M. penetrans* a gazda intracelluláris vezikuláiban osztódni képes (Lo és mtsai. 1993).

5. Anyag és módszer

5.1. A Mycoplasma-törzsek

A munka során 12 különböző eredetű, virulenciájú és eltérő biológiai tulajdonsággal rendelkező MG törzset vizsgáltam, melyek az alábbiak voltak:

- Az MG F vakcina törzs

- Az MG TS-11 vakcina törzs

- Az MG MK-7 (patogén) és MG MS-16 (nem patogén) törzseket csirke légzsákból izolálták Japánból. Az MG FS-9 (1226) magyarországi csirke légzsákokból származó izolátum (Stipkovits és mtsai. 1993), az MG X-95 és az MG S6 törzseket szintén csirke légzsákból izolálták. Mindkét törzset a WHO/FAO Collaborating Centre for Reference and Research on Mycoplasmas (Mycoplasma Reference Facility, NCTC, Central Public Health Laboratory, London, UK) bocsátotta rendelkezésünkre. Az MG Rlow törzs USA-ból származó, magas patogenitású törzs. Az MG Rhigh az Rlow-ból passzálással (kb 160 passzázsszám) nyert törzs. Az MG Rhighm törzset az MG Rhigh törzsből nyertük az MG Rhigh glükóz helyett mannózt tartalmazó B táptalajban való felszaporításával. Az MG RCl az MG Rhigh HeLa sejteken nevelt klónja. Az MG M3 pedig Rlow törzsből származó haemadszorpciós mutáns. Az MG Rlow törzset és származékait, valamint az MG M3 törzset Renate Rosengarten bocsátotta rendelkezésünkre (Institute of Bacteriology, Mycology and Hygiene, Univ. Vet. Med., Vienna).

Az MG törzsek mellett az MI 4229 törzset is bevontam a vizsgálatokba. Az MI-t Bradbury és munkatársai Franciaországban (Bradbury és mtsai. 1993) izolálták kacsákból és libákból. A törzs nagyon hasonlóan mutatkozott az MG-hez, azonban molekuláris biológiai tulajdonságai alapján új fajként írták le.

5.2. A PCR során vizsgált gének

Valamennyi PCR vizsgálat alapjául az MG R törzs ismert genomja szolgál (génbanki szám: AE015450), vagyis ezen törzs génjeivel összehasonlítva végeztünk a Mycoplasma-törzsek között vizsgálatokat. A gének nevei mellett zárójelben a génbankban található azonosítók szerepelnek. A Mycoplasma-törzsek összehasonlításául szolgáló gének tehát a következők:

- a) *recA* gén (AF443795)
- b) *crmA* gén (AE016967)
- c) *crmB* gén (AE016967)
- d) *crmC* gén (AE016967)
- e) *gapA* gén (AE016967)
- f) *pvpA* gén (AE016969)
- g) *mgc2* gén (AE016967)
- h) *LP* gén (AF075588) (funkciója ismeretlen)

5.3. Mycoplasma tenyésztés

A liofilizált törzsek mindegyikét folyékony B táptalajba oltottuk (Ernø és Stipkovits, 1973a, b), majd a törzsek elszaporodásának ellenőrzésére a levestenyészeteket minden második nap B szilárd táptalajra csurgattuk (MA). A tenyészetek inkubálását 37°C-on 5% CO₂ jelenlétében végeztük és naponta figyeltük a táptalaj színének változását. Amennyiben a táptalaj színe változást mutatott (a tenyészet sárga színének megjelenését a táptalaj pH-jának csökkenése okozza, melyhez indikátorként a fenolvörös szolgál), a tenyészetet tovább oltottuk, míg végül 500 ml mennyiséget nem kaptunk. Ezt a mennyiséget használtuk a továbbiakban DNS preparálás céljára, és ez a mennyiség tette lehetővé, hogy a munka egésze alatt ugyanazon tenyészetből származó DNS-t vizsgáljunk. Az Rhigm törzs esetében a tenyésztést nem glükóz, hanem mannóz jelenlétében végeztük. Az MG TS-11 vakcina törzs módosított Hayflick médiumban (Bradbury, 1977), 33°C-on 5% CO₂ jelenlétében tenésztethető.

5.4. DNS kivonás

A mycoplasma DNS kivonását minden esetben ugyanazon a módon végeztük. A tenyészet 1 ml-ét 10 percig centrifugáltuk 10000 g sebességgel (Biofuge fresco Soravill Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, Germany), majd az üledék TNE pufferrel (500 µl) történő mosása után 240 µl mennyiségű lízispufferrel és 8 µl 20 mg/ml koncentrációjú proteináz-K enzimmel (Invitrogen life technologies, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California, USA, Catalog Number: 25530-015) két órán keresztül, 55 °C-on lizáltuk a sejteket. A lízispuffert laborunkban állítottuk elő tízszeres hígítású TNE puffer, 10%-os SDS és 10%-os Sarcosyl 10:1:1 arányú elegyéből. A TNE puffer 1000 ml-je (pH = 7,3) 12,1 g TRIS-t, 58,4 g nátrium-kloridot és 3,72 g EDTA-t tartalmaz. A lizálást követően 200 µl mennyiségű fenol-kloroform-izoamil-alkohol 25:24:1 arányú keverékével távolítottuk el a fehérjéket, majd a DNS-t 3M nátrium-acetátot (végkoncentráció 10v/v%) tartalmazó, 2,5-szeres mennyiségű abszolút etanollal csaptuk ki -20 °C-on 1 éjszakán át. Centrifugálás (10 percig, 10000 g sebességgel, 4 °C-on) és 70%-os alkoholos mosás után szárítottuk a mycoplasma DNS-t, majd steril MilliQ (Millipore) vízben oldottuk a mintákat. A preparálás végeztével a minta DNS mennyiségét spektrofotométer (típus: M330, ComSpec Co., UK) segítségével, $\lambda = 260$ nm hullámhosszúságú fényrel átvilágítva, PBS pufferrel szemben mértük.

5.5. A RAPD PCR

A munka során az előző pontban leírt módon tisztított mycoplasma DNS-t (teljes genomot) használtuk fel. A teljes genom vizsgálatát RAPD PCR segítségével végeztük irodalmi primereket felhasználva. A RAPD PCR-hez, valamint az egyes génekre specifikus PCR-ekhez szükséges primereket minden esetben az Invitrogen life technologies (1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California, USA) állította elő. A primereket minden PCR során 50 pmol/µl koncentrációban alkalmaztuk. A PCR reakciókhoz szükséges puffer, magnézium-klorid, Taq polimeráz és dNTP mix szintén az Invitrogen life technologies-től származott:

Taq DNA Polymerase, 5 U/µl (Catalog Number: 11615-010)

10X PCR Buffer minus Mg (200 mM Tris-HCl, pH = 8,4 és 500 mM KCl) (Catalog Number: 11615-010)

50 mM Magnesium Chloride (Catalog Number: 11615-010)

10 mM dNTP Mix, PCR Grade (Catalog Number: 18427-013).

Minden PCR reakciót a Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 típusú gép (The Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, Connecticut, USA) segítségével végeztük el.

A PCR reakciót követően az amplifikált termékeket 0,005 v/v% etídium bromidot (Invitrogen life technologies, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California, USA, Catalog Number: 15585-011) tartalmazó, 1,2 m/m%-os agaróz gélben 150 V feszültség alkalmazásával futtattuk (Agarose, LE, Analytical Grade, Promega, 2800 Woods Hollow Road, Madison, USA, Catalog Number: V3121). Az elektroforézist követően (302 nm hullámhosszú) UV átvilágító lámpán digitális kamerával (Kodak Digital Science DC120) fotóztuk a géleket és a Kodak Digital Science 1D v. 3.0.2 programot használtuk. A minták mellett futtatott marker a Promega cégtől származott (100 bp DNA Ladder, Promega, 2800 Woods Hollow Road, Madison, USA, Catalog Number: G2101).

5.6. A genomon végzett RAPD PCR reakciók részletes leírása

RAPD PCR-t Fan (1995) és Charlton (1999b) munkáit követve végeztük el a fent említett törzsekkel (5.5a. táblázat). Az irodalomban közölt PCR reakció összetételét mindkét esetben az 5.1. táblázat szerint módosítottuk.

5.1. táblázat. A két RAPD PCR során alkalmazott összetétel (1 mintára számolva, végtérfogat 50 µl).

PCR tisztaságú desztillált víz	49 µl-re kiegészítve
10 X PCR Buffer minus Mg	5 µl
10 mM dNTP mix, PCR tisztaságú	1 µl
50 mM Magnézium-klorid	4 µl
Primerek (50 pmol/µl)	1 µl
Taq DNA Polymerase, Recombinant	0,5 µl
DNS minta	1 µl

Fan és mtsai. (1995) nyomán a PCR reakció kondíciója a következő volt: 3 ciklusban 94°C 15 mp., 28°C 2 perc, 74°C 3 perc. Ezt követően 35 ciklusban 94°C 15 mp., 45°C 2 perc és 74°C 3 perc.

Charlton (199b) primereivel végzett PCR során viszont a következő kondíciót használtuk: 1 ciklusban 95°C 5 perc, majd 45 ciklusban 95°C 1 perc, 36°C 1 perc és 72°C 2 perc.

5.7. Az egyes génszakaszokra specifikus PCR reakciók, valamint az RFLP analízis

Az egyes génszakaszokra tervezett PCR reakciók során szintén a teljes genomot használtuk. Az egyes génekre több specifikus PCR-t terveztünk oly módon, hogy a keletkezett ampliconok a gén teljes egészét lefedjék. A primerek tervezéséhez a PRIMER Primer Designer 2.0 (Scientific & Educational Software) programot használtuk.

Az egyes génszakaszokra specifikus PCR reakciók termékeivel RFLP analízist végeztünk. A restriktív enzimek kiválasztását, valamint az egyes emésztett termékek méretének meghatározását (minden PCR esetben az MG R törzs szekvencia adatai alapján) az interneten elérhető Restriction Mapper 3.0 program (<http://www.restrictionmapper.org/>) segítségével végeztük el. A kiválasztott enzimek közül (*AluI*, *FokI*, *HaeIII*, *HpaI*, *HphI*, *MboI*, *PvuII*, *RsaI*, *VspI*) az adott PCR termék emésztése során kettőt, esetleg hármat használtunk (5.5a. táblázat). Az emésztést 20 µl össztérfogatban végeztük el, amely 13,2 µl desztillált vizet, 2 µl enzim számára optimális 10X puffert, 0,8 µl restriktív enzimet és 4 µl PCR terméket tartalmazott. Az inkubálást az enzim optimális működésének megfelelően 37, illetve 55°C-on 2 órán keresztül végeztük. A restriktív enzimek mindegyike a Fermentas (Fermentas International INC. Harrington Court, Burlington, Ontario, Canada) cégtől származott.

A PCR-t és az RFLP-t követően a termékeket a korábban leírt agaróz gélelektroforézissel futtattuk, majd a gél fotóztuk.

5.8. Az egyes génszakaszokra specifikus PCR reakciók és az RFLP során használt enzimek részletes leírása

PCR reakciókat a már említett génszakaszokra (*recA*, *crmA*, *crmB*, *crmC*, *gapA*, *mgc2*, *LP* és *pvpA*) terveztünk, illetve a *recA*, *gapA*, *mgc2*, *LP* és *pvpA* gének esetében a más szerzők által használt PCR elegy összetételét megváltoztatva is elvégeztük a PCR-t.

Az egyes génekre tervezett PCR elegy összetételét az 5.2. táblázatban feltüntetett módon használtuk. Több próbálkozást követően ezen összetétel mellett volt az elvégzett PCR reakciók többsége sikeres.

5.2. táblázat. Az általunk beállított PCR reakciók során használt összetétel 1 mintára megadva, végtérfogat 50 μ l.

PCR elegy összetevői	Legtöbb génre specifikus PCR	<i>pvpA</i> PCR
PCR tisztaságú desztillált víz	36,75 μ l	38,2 μ l
10 X PCR Buffer minus Mg	5 μ l	5 μ l
10 mM dNTP mix, PCR tisztaságú	1 μ l	1,5 μ l
50 mM Magnézium-klorid	4 μ l	3 μ l
Primerek (50 pmol/ μ l)	1 μ l	0,5 μ l
Taq DNA Polymerase, Recombinant	0,25 μ l	0,3 μ l
DNS minta	1 μ l	1 μ l
Összesen	50 μ l	50 μ l

a.) *recA* génre specifikus PCR és RFLP analízis

A gén (1800 bp hosszúságú szakasz) vizsgálatát elsőként Dusan Bencina (Ljubljana Egyetem, Szlovénia) által tervezett primerek segítségével (szóbeli közlés) végeztük el (5.3a. táblázat). A három PCR mindegyikét az 5.2. táblázat alapján állítottuk be. Mindhárom PCR reakció az alábbiak szerint zajlott: 1 ciklus 95°C-on 5 percig, 35 ciklus (95°C-on 1 perc, 50°C-on 30 mp., 72°C-on 1 perc), majd 1 ciklus 72°C-on 5 percig.

Emellett saját tervezésű primereket és PCR rendszert használtunk a *recA* gén jellemzésére, illetve a különböző *Mycoplasma*-törzsek ezen a génen alapuló összehasonlítására (5.3a. táblázat). A PCR elegy összetételét az 5.2. táblázat tartalmazza. A *recA* génre specifikus, általunk tervezett PCR-t a következők szerint végeztük: 1 ciklus 94°C 5 perc, 35 ciklus (94°C 1 perc, 46°C 45 mp., 72°C 30 mp.) és 1 ciklus 72°C 5 perc.

A keletkezett amplikonok restrikciós emésztéshez használt enzimeket szintén az 5.3a. táblázat összegzi.

b.) *crmA* génre specifikus PCR és RFLP

A 3180 bp hosszúságú *crmA* gén jellemzése során saját tervezésű primereket használtunk. A primerek tulajdonságai az 5.3a. táblázatban láthatóak. Mind az öt PCR elegy összetételét az 5.2. táblázat mutatja be. Az 1., 3., 4. és 5. PCR reakció az alábbiak szerint játszódott le: 1 ciklusban 94°C 5 perc, 25 ciklusban (94°C 1 perc, 50°C 30 mp., 72°C 30 mp.) és 1 ciklusban 72°C 5 perc. Ettől eltérően a 2. PCR reakció annealing hőmérséklete 54°C volt.

Az RFLP analízis során mind az öt PCR termékeit felhasználtuk (5.5a. táblázat).

c.) *crmB* génre specifikus PCR és RFLP

Saját tervezésű primereket és RFLP analízist használtunk a 2760 bp hosszúságú *crmB* gén jellemzésére is (5.3b. táblázat). Mind a négy PCR elegy összetételét az 5.2. táblázat szerint állítottuk össze. Az 1. PCR reakció a következő kondíció szerint zajlott: 1 ciklusban 94°C 5 perc, 25 ciklusban (94°C 1 perc, 47°C 30 mp., 72°C 30 mp.) és 1 ciklusban 72°C 5 perc. A 2. és a 3. PCR annealing hőmérséklete a fent leírttól különbözően 49°C, míg a 4. PCR reakcióé 48°C.

d.) *crmC* génre specifikus PCR és RFLP

A *Mycoplasma*-törzsek *crmC* gén (2520 bp hosszúságú) alapján történő összehasonlítására ugyancsak saját tervezésű primereket használtunk (5.3b. táblázat). Ugyanebben a táblázatban láthatóak az alkalmazott restrikciós enzimek is. Az öt PCR reakciót ugyancsak az 5.2. táblázat szerint állítottuk össze. Az 1. PCR reakció esetében az alábbiakban feltüntetett kondíciót használtuk: 1 ciklusban 94°C 5 perc, 35 ciklusban (94°C 1 perc, 45°C 30 mp. és 71°C 30 mp). Ezt követően 1 ciklusban 71°C-t 5 percig használtunk. A 2., 3., 4. és 5. PCR reakció során az annealing hőmérséklet 48°C volt.

e.) *gapA* génre specifikus PCR és RFLP

A különböző *Mycoplasma*-törzsek *gapA* gén (3372 bp hosszú szakasz) alapján történő összehasonlító vizsgálatát először Kleven által javasolt primerekkel (Kleven és mtsai. 2004), a PCR kondíciót módosítva végeztük el (5.3b. táblázat). Az általunk beállított PCR elegy összetétele ebben az esetben is működött, így mindkét PCR elegy összetételét az 5.2. táblázat mutatja. A PCR reakciókat a következők szerint állítottuk be: 1 ciklusban 94°C 3 perc, 35 ciklusban (94°C 30 mp., 55°C 30 mp., 72°C 1 perc), majd 1 ciklusban 72°C 10 perc.

Emellett az adott gén vizsgálatára (illetve a *Mycoplasma*-törzsek összehasonlítására) általunk tervezett PCR-RFLP-módszereket is használtunk (5.3b. táblázat). A hat PCR elegy összetétele szintén az 5.2. táblázatban látható. Az 1. és a 6. reakciónál az alábbi kondíciót állítottuk be: 1 ciklusban 94°C 5 perc, 35 ciklusban (94°C 1 perc, 50°C 30 mp., 75°C 30 mp.), majd 1

ciklusban 75°C 5 perc. Ettől eltérően a 2., 3., 4. és 5. PCR reakciója a következők szerint zajlott: 1 ciklus 94°C 5 perc, 35 ciklus (94°C 1 perc, 49°C 30 mp., 72°C 30 mp.), majd 1 ciklusban 72°C 5 perc.

f.) *mgc2* génre specifikus PCR és RFLP analízis

Csakúgy, mint a *gapA* gén vizsgálata során, a 894 bp hosszú *mgc2* gén alapján történő összehasonlító vizsgálatokat szintén elsőként irodalmi primerekkel (Kleven és mtsai. 2004), a PCR kondíciót módosítva végeztük el (5.3b. táblázat). A PCR-t ugyancsak az 5.2. táblázatban feltüntetett módon alkalmaztuk. A PCR reakció során az alábbi kondíciót állítottuk be: 1 ciklus 94°C 3 perc, 35 ciklus (94°C 30 mp., 55°C 30 mp., 72°C 1 perc), majd 1 ciklus 72°C 10 perc.

Emellett az általunk tervezett primerek tulajdonságait és az RFLP során alkalmazott enzimeket szintén az 5.3b. táblázatban foglaljuk össze. A PCR elvégzése során ebben az esetben is használhattuk az 5.2. táblázatban feltüntetett reakció elegyet. A PCR-t a következő kondíció szerint végeztük el: 1 ciklus 94°C 5 perc, 35 ciklus (94°C 1 perc, 53°C 30 mp., 76°C 30 mp.), majd 1 ciklus 76°C 5 perc.

g.) *LP* génre specifikus PCR és RFLP analízis

A *Mycoplasma*-törzsek összehasonlítását a Nascimento és mtsai. által *LP* génnek nevezett szekvencia alapján is elvégeztük. Az általa javasolt primerek (Nascimento és mtsai. 1991) segítségével valamint a PCR reakcióelegyének megváltoztatásával végeztük munkánkat (5.3b. táblázat). Az 5.2. táblázatban látható PCR összetételt használtuk ebben az esetben is. A PCR reakció során az alábbiakban feltüntetett kondíciót alkalmaztuk: 1 ciklusban 95°C 5 perc, 30 ciklusban (95°C 1 perc, 55°C 2 perc, 72°C 1perc), majd 1 ciklusban 72°C 5 perc.

h.) *pvpA* génre specifikus PCR és RFLP analízis

A *pvpA* gén vizsgálata során a Liu és mtsai. (2001) által javasolt primereket használtuk. Ebben az esetben is megváltoztattuk a szerzők által javasolt PCR kondíciót (5.2. táblázat). A primerek tulajdonságait és az alkalmazott restriktív enzimeket az 5.3b. táblázat mutatja.

A PCR reakció során használt kondíció a következő volt: 1 ciklus 94°C 3 perc, 35 ciklus (93°C 30 mp., 55°C 30 mp., 72°C 1 perc), majd 72°C 10 perc.

5.3a. táblázat. Összefoglaló táblázat a munka során alkalmazott primerekről, azok célgénjeiről és a restriktív enzimekről.

Célgén/PCR	PCR száma	Primer	Szekvencia 5'-3'	Kötési hely (bp)	Restriktív enzimek	Hivatkozás		
RAPD PCR	-	M16SPCR5'	AGGCAGCAGTAGGGAAT	-	-	Fan és mtsai, 1995		
		M13F	GTAAAACGACGGC					
		S1OLIGO3'	CATAACTAACATAAGGGCAA					
		-	-	P1	GGTGCGGGAA	-	-	Charlton és mtsai, 1999b
				P2	GTTTCGCTCC			
				P3	GTAGACCCGT			
				P4	AAGAGCCCGT			
				P5	AACGCGCAAC			
P6	CCCGTCAGCA							
<i>recA</i> (AF443795)	B1	F1	ACGTTTAGGAATAGATTTAACAAAAT	876	-	Bencina, szóbeli közlés		
		R1	CGATACATTGTGTTTAGCTAATAATG	1126				
	B2	F2	AAAACAGTAAAAGAAACAATGACA	548	-			
		R2	GTGTTGAAAGCTTGTTTTAGTTA	1324				
	B3	F3	CGTTTTAGAATTGATCTTTTT	430	<i>VspI, HphI</i>			
		R3	GTCAATAAGCCCACGATTAG	1625				
	4	RecA-F6	GAGTTAAAAGACCTAGAAAGC	154	<i>VspI, HphI</i>	Jelen munka		
		RecA-R7	GTATGAGAATCAACTACCTG	939				
<i>crmA</i> (AE016967)	1	CrmA-F1	GGTGGATTAGCTGTATTTGG	40	<i>MboI, VspI</i>	Jelen munka		
		CrmA-F5	CCACTAACTCTACCTACTGG	719				
	2	CrmA-F4	CTGCAGTTGTTTCCTTGACCA	683	<i>MboI, HphI</i>			
		CrmA-R6	TTCCAGGACCTGTTGAACCA	1312				
	3	CrmA-F5	CGGAACAACGACAACAACCTG	1263	<i>AluI, RsaI</i>			
		CrmA-R7	GTGTGTCACCTTGTGCTCTT	1864				
	4	CrmA-F6	AGCACAAGGTGACACACCAG	1848	<i>MboI, RsaI</i>			
		CrmA-R8	GCATTAGCAGGAGTGAAGTC	2621				
	5	CrmA-F7	GACTTCACTCCTGCTAATGC	2602				
CrmA-R9		TGGCTTAGGAGCAGTTGGTT	3156					

5.3b. táblázat. Összefoglaló táblázat a munka során alkalmazott primerekről, azok célgénjeiről és a restrikciós enzimekről. Folytatás.

Célgén	PCR száma	Primer	Szekvencia 5'-3'	Kötési hely (bp)	Restrikciós enzimek	Hivatkozás	
<i>crmB</i> (AE016967)	1	CrmB-F1	GCTCACATCAAAAGATCGCT	10	<i>HphI, VspI</i>	Jelen munka	
		CrmB-R7	ACCACACCTTGTGAAGTCAG	584			
	2	CrmB-F3	CTGACTTCACAAGGTGTGGT	565	<i>FokI, RsaI</i>		
		CrmB-R8	TTAGCGCTCTTGGACCAACT	1300			
	3	CrmB-F4	GTTGGTCCAAGAGCGCTAAT	1282	<i>HaeIII, RsaI</i>		
		CrmB-R9	ATCAGATCAAGCCGATTAGG	2075			
4	CrmB-F5	AACCAACCTAATCGGCTTGA	2050	<i>FokI, VspI</i>			
	CrmB-R10	TAACCCGTGAACGATCATCT	2704				
<i>crmC</i> (AE016967)	1	CrmC-F1	CAGTCTTATCTTATCGTTGT	63	<i>AluI, HphI</i>	Jelen munka	
		CrmC-R1	GATCATTACTACCGAACACC	709			
	2	CrmC-F3	TGCGACCTTATACAATCGGA	531	<i>AluI, RsaI</i>		
		CrmC-R2	CACTAATAGGTGCTGGCACT	1030			
	3	CrmC-F4	CCAGCTTACTTCGTAATTGG	904	<i>HphI, VspI</i>		
		CrmC-R3	CTTAGGTATCATTTCCCATC	1472			
	4	CrmC-F5	GATATCAGTATGGCTGGGTT	1405	<i>FokI, HphI</i>		
		CrmC-R4	GACTGTAATAGTTCCCATCA	1999			
	5	CrmC-F6	CTCCTGGTGAGATCGATTGA	1892	<i>HpaI, VspI</i>		
		CrmC-R6	GCTTGAGGTCTTGGATGAAC	2507			
<i>gapA</i> (AE016967)	1	GapA-F1	CTCCTCTTGCCTTAATCGGT	41	<i>RsaI, VspI</i>	Jelen munka	
		GapA-R1	AGCAGTAGGAGTCATCGTTC	711			
	2	GapA-F3	TGCGAGTTCGACTGCTAGAC	642	<i>HpaI, MboI</i>		
		GapA-R4	ACCGTATGGATAACCAACAG	1359			
	3	GapA-F4	AACTGCTGAAGCTCCAGGAA	1311	<i>HphI, PvuII</i>		
		GapA-R5	CCTGCTACTGTAGACGCTAA	2000			
	4	GapA-F5	TGCTATGTTAGATGGTCGTC	1878	<i>MboI, VspI</i>		
		GapA-R6	CTTACATTAACAGCAGCGGT	2528			
	5	GapA-F6	CAGCAAGTAACGCAGTTATT	2402	<i>HphI, RsaI</i>		
		GapA-R7	GTGGAACAGCAACGTATTTCG	2929			
	6	GapA-F7	TTGATCGTTCTAGAGCAACC	2849	<i>PvuII, VspI</i>		
		GapA-R8	CTTAGTTGGTGTGGAGCTT	3360			
	K1	GAPA-1F	GGTATTTTATTATCAGCGATTTC	1357	<i>PvuII, VspI</i>		Kleven és mtsai, 2004
		GAPA-1R	TTAACATAGATTGAACCGTTGTA	2336			
K2	Myc-3F	TTCTAGCGCTTTARCCCTAAACCC	2601	<i>MboI, VspI</i>	Kleven és mtsai, 2004		
	Myc-4R	CTTGTGGAACAGCAACGTATTTCGC	2932				
<i>mgc2</i> (AE016967)	1	Mgc2-F1	GTTATTGCGCTTGGAACTGG	70	<i>HaeIII, PvuII, VspI</i>	Jelen munka	
		Mgc2-R1	GGCTGATTCATTCCCTTGATT	839			
	K1	Mgc2-1F	GCTTTGTGTTCTCGGGTGCTA	54	<i>PvuII, VspI</i>		Kleven és mtsai, 2004
Mgc2-1R		CGGTGGAAAACCAGCTCTTG	875				
<i>LP</i> (AF075588)	1	Amp-F1	GGATCCCATCTCGACCACGAGAAAA	1	<i>FokI, HphI</i>	Nascimento és mtsai, 1991	
		Amp-R1	AGTAGTCAATGAGTGACTAACTTTC	732			
<i>pvpA</i> (AE016969)	1	PvpA-3F	GGTAGTCCTAAGTTATTAGGTC	583	<i>AccI, PvuII, ScrFI</i>	Liu és mtsai, 2001	
		PvpA-2R	GGACGTSGTCTGGCTGGTTAGC	1079			

5.9. Szekvencia analízis

A keletkezett nagyszámú amplicon közül szekvencia analízist az 5.4. táblázatban feltüntetett PCR termékek (a két primer pár közé eső szekvenciák) és MG törzsek esetében végeztünk. A PCR-RFLP mintázatok alapján ezek a szekvenciák voltak azok, melyek variabilitást mutattak.

5.4. táblázat. A különböző *Mycoplasma*-törzsek és PCR reakciók esetében elvégzett szekvencia analízis. ¹: génbanki adatok alapján, ²: génbanki szekvenciához viszonyított pozíciókban

Ampliconok	Gén mérete (bp) ¹	Szekvenált termék (bp) ²	Vizsgált törzsek			
			MG TS-11	MG Rhigh	MG M3	MG X-95
Általunk tervezett, <i>recA</i> génre specifikus PCR	1020	154-939	+	+	+	-
Általunk tervezett, <i>crmA</i> génre specifikus 3. PCR	3180	1263-1864	+	+	+	+
Általunk tervezett, <i>crmA</i> génre specifikus 5. PCR		2602-3156	+	+	+	+
Általunk tervezett, <i>crmC</i> génre specifikus 1. PCR		63-709	+	+	+	-
Általunk tervezett, <i>crmC</i> génre specifikus 2. PCR	2520	531-1030	+	+	+	-
Általunk tervezett, <i>crmC</i> génre specifikus 4. PCR		1405-1999	+	+	+	+
Általunk tervezett, <i>gapA</i> génre specifikus 4. PCR	3372	1878-2528	+	+	+	-
Általunk tervezett, <i>mgc2</i> génre specifikus PCR	894	70-839	+	+	+	+
Liu és munkatársai által tervezett (2001), általunk módosított <i>pvpA</i> génre specifikus PCR	1149	583-1079	+	+	+	+

A PCR termékeket az agaróz gélből GeneClean II Kit segítségével tisztítottuk (Q-Biogene, Montreal, Canada, Catalog Number: 1001-400). A tisztított PCR termékeket ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) típusú géppel szekvenáltuk. A szekvenciák elemzése Chromas 1.45 számítógépes program segítségével történt. A szekvenciák illesztéséhez a Multalin interneten is elérhető programot használtuk (Corpet, 1988).

5.10. Statisztikai elemzések

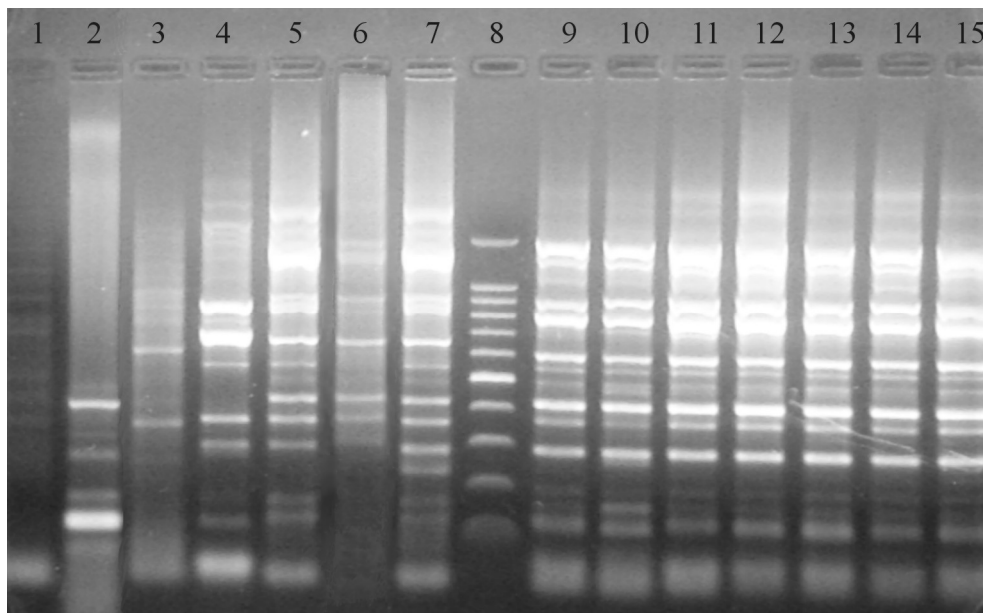
A vizsgált törzsek RAPD PCR, valamint minden vizsgált génszakasz PCR és RFLP mintázatai alapján bináris táblázatot készítettünk. A bináris adatokat többváltozós statisztika segítségével a Past 0.45 (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>) programcsomaggal elemeztük. A bináris adatok alapján távolság-mátrixok állíthatók elő, melyek kiindulópontjai más többváltozós statisztikai eljárásoknak (például osztályozásoknak és ordinációknak). Ilyen távolság-mátrixok előállítása távolságfüggvények segítségével történik. A munka során euklideszi távolságfüggvényt alkalmaztam. A távolság mátrixok további elemzésére ordinációkat (NMDS) és hierarchikus osztályozásokat használtunk (Podani, 1997).

6. Eredmények

6.1. A genomon végzett RAPD PCR reakciók eredményei

A *Mycoplasma*-törzseket a DNS mintázatuk alapján Fan és munkatársai (1995), valamint Charlton és munkatársai (1999b) primereit használva egyaránt hat csoportba soroltuk be (1. ábra, 6.1. táblázat).

Az 1. ábrán és a 6.1. táblázatban látható, hogy a Fan és munkatársai (1995) által tervezett PCR vizsgálatok alapján az MI 4229, az MG F, az MG TS-11 és az MG MS-16 külön csoportokat alkotnak (A, B, C és E), az MG MK-7 és az MG S6 egy csoportba tartoznak (D). Ugyancsak egy csoportot alkotnak az MG X-95, az MG FS-9 (1226), az MG RCl, az MG Rhigh, az MG Rlow, az MG Rhighm és az MG M3 törzsek (F).



1. ábra. Fan és munkatársai által tervezett (Fan és mtsai. 1995), általunk módosított RAPD PCR eredménye. 1: negatív kontroll, 2: MI, 3: MG F, 4: MG TS-11, 5: MG MK-7, 6: MG MS-16, 7: MG S6, 8: 100 bp DNS marker, 9: MG FS-9, 10: MG X-95, 11: MG RCl, 12: MG Rhigh, 13: MG Rlow, 14: MG Rhighm, 15: MG M3.

Ugyanakkor Charlton és munkatársai (1999b) által alkalmazott primerek segítségével nyert DNS mintázat alapján az MI 4229, az MG F, az MG MS-16 és az MG X-95 alkotnak külön csoportokat, illetve rendelkeznek egyedi DNS mintázattal (I, II, IV és V). Egy csoportba tartozik az MG TS-11, az MG MK-7 és az MG S6 (III), valamint az MG FS-9 (1226), az MG RCI, az MG Rhigh, az MG Rlow, az MG Rhighm és az MG M3 törzsek (VI).

6.1. táblázat. Fan és munkatársai (1995), valamint Charlton és munkatársai (1999b) által tervezett primerek segítségével végzett RAPD PCR eredménye.

	Fan és mtsai.	Charlton és mtsai.
Törzsek	Csoportok	
MI 4229	A	I
MG F	B	II
MG TS-11	C	III
MG MK-7	D	
MG S6		
MG MS-16	E	IV
MG X-95	F	V
MG FS-9 (1226)		VI
MG RCI		
MG Rhigh		
MG Rlow		
MG Rhighm		
MG M3		

6.2. Az egyes génszakaszokra specifikus PCR reakciók és az RFLP eredményei

A PCR, illetve az RFLP során keletkezett termékek méretének pontos meghatározása csak a szekvencia adatok ismerete alapján lehetséges. Azon törzsek és PCR termékek esetében, melyeknél nem végeztünk szekvencia analízist, a keletkezett termékek méretei becsült értékek, tájékoztató jellegűek, azonban a keletkezett mintázat is hordoz információt. Amennyiben a vizsgált törzsek termékei (akár PCR, akár RFLP termékek) az elektroforézis során az MG Rlow PCR és RFLP termékeivel azonos magasságban adtak fragmentet, azok méretét az MG Rlow termékeinek méreteivel tettük egyenlővé.

a.) *recA* génre specifikus PCR és az RFLP analízis eredménye

- Bencina által tervezett három pár primert és így három PCR rendszert használva az eredmények a következők voltak. A B1. PCR-t alkalmazva 250 bp, a B2. PCR-t alkalmazva 777 bp, míg a B3. PCR-t alkalmazva 1196 bp méretű termék keletkezett minden vizsgált törzs esetében. Mindhárom PCR kimutatja az összes MG törzset és emellett az MI 4229-et is.

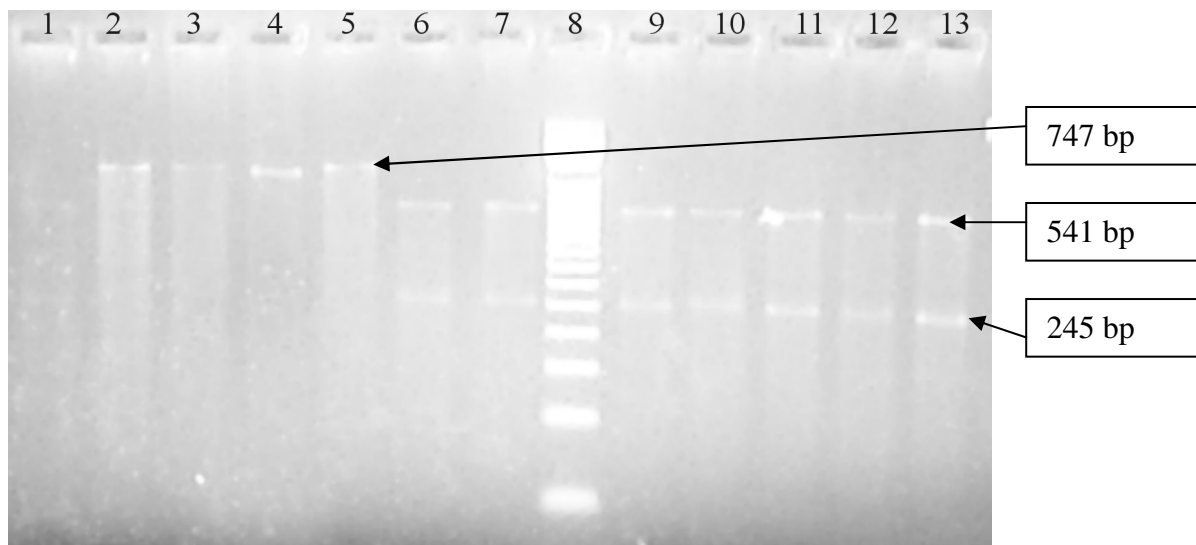
A B3. PCR rendszer által amplifikált termékek RFLP vizsgálata során a *VspI* restriktációs enzimet használva 696, 472 és 28 bp méretű termék, míg a *HphI*-et alkalmazva 567, 508 és 121 bp méretű termék keletkezett minden törzs esetében.

- A saját tervezésű primerekkel és RFLP analízissel kapott eredmények az alábbiak.

A szekvenciaadatok és a DNS marker alapján a PCR során az MI 4229 kivételével minden törzs esetében 786 bp termék keletkezett (az MG M3 esetében 788 bp, 5. ábra). Tehát a Bencina és munkatársai által tervezett primer segítségével az MI 4229 is kimutatható, míg az általunk tervezett PCR MG specifikus. A Bencina és munkatársai által tervezett PCR termékeit emésztve a törzsek mintázatai között nem mutatkozott különbség. Az általunk tervezett PCR során keletkezett amplikon *HphI* restriktációs enzimmel történő hasításakor a keletkezett termékek mérete 505 és 281 bp volt. A szekvencia adatok alapján az MG Rhigh emésztésekor 505 és 280 bp, míg az MG M3 emésztésekor 507 és 281 bp fragmentet kaptunk. Ugyanakkor *VspI*-et használva az MG X-95, az MG FS-9 (1226), az MG RCl, az MG Rlow, az MG Rhigh és az MG Rhighm törzsek esetében 541 és 245 bp méretű fragment keletkezett

(MG M3 esetében pedig 543 és 245 bp) (A csoport). Ugyanez az enzim az MG TS-11, az MG MK-7, az MG S6 és az MG MS-16 törzsek amplikonjait

747 és 39 bp méretű termékekké hasította (B csoport). Az MG F törzs esetében olyan kevés mennyiségű amplikon keletkezett, hogy a *VspI* enzim hatékonysága jelentős mértékben csökkent, így nem láttunk terméket (2. ábra).



2. ábra. A *recA* génre specifikus, általunk tervezett PCR amplikonjának *VspI* restriktációs enzimmel történő emésztése. 1: MG F, 2: MG TS-11, 3: MG MK-7, 4: MG MS-16, 5: MG S6, 6: MG FS-9, 7: MG X-95, 8: 50 bp DNS marker, 9: MG RCl, 10: MG Rhigh, 11: MG Rlow, 12: MG Rhighm, 13: MG M3.

b.) *crmA* génre specifikus PCR és RFLP analízis eredménye

A *crmA* gén (3180 bp hosszúságú) jellemzésére tervezett PCR eredmények összefoglalva a 6.2. táblázatban láthatóak.

6.2. táblázat. Az általunk tervezett, *crmA* génre specifikus PCR-ek során keletkezett amplikonok.

Törzsek	A termék mérete (bp)				
	1 PCR	2 PCR	3 PCR	4 PCR	5 PCR
MI 4229	-	-	-	-	555
MG F	680	-	-	-	555
MG TS-11	680	630	598	774	552
MG MK-7	680	-	520	774	555
MG S6	680	-	520	774	555
MG MS-16	680	-	520	774	555
MG FS-9 (1226)	680	630	602	774	555
MG X-95	680	630	597	774	530
MG RCI	680	630	602	774	555
MG Rhigh	680	630	602	774	555
MG Rlow	680	630	602	774	555
MG Rhighm	680	630	602	774	555
MG M3	680	630	729	774	555

A táblázatból látható, hogy a DNS marker alapján az 1. PCR eredményeként az MI 4229 törzs kivételével minden MG törzs esetében 680 bp méretű termék keletkezett.

A 2. PCR esetében ugyancsak nem kaptunk amplifikált terméket az MI 4229 törzsnél, de emellett szintén nem láttunk pozitív reakciót az MG F, az MG MK-7, az MG S6 és az MG MS-16 törzsek esetében sem. A többi törzs amplifikációjakor 630 bp-nyi terméket kaptunk.

A 3. PCR során az MI 4229 és az MG F törzsek esetében szintén nem kaptunk terméket. Ugyanakkor a szekvencia adatok és a DNS marker alapján az MG TS-11 esetében 598 bp, az MG X-95 esetében 597 bp, az MG FS-9 (1226), az MG RCI, az MG Rhigh, az MG Rlow és az MG Rhighm törzs esetében 602 bp, az MG M3 törzs esetében 729 bp, az MG MK-7, az MG S6 és az MG MS-16 törzs esetében pedig 520 bp termék keletkezett (6. ábra).

A 4. PCR eredményeként az MI 4229 és az MG F törzsek kivételével minden MG törzs esetében 774 bp méretű termék keletkezett.

A szekvencia adatok alapján az 5. PCR során az MG X-95 törzs esetében 530 bp méretű terméket kaptunk. Az MG TS-11 kivételével (552 bp) összes többi törzs esetében az amplifikált termék mérete 555 bp volt (7. ábra).

Az PCR reakciók termékeit restriktív emésztésnek vetettük alá. Az 1. PCR termékeinek *MboI* restriktív enzimmel történő hasítása során 293, 252, 75 és 60 bp méretű termékek, míg a *VspI* enzimmel történő hasítás során 398 és 282 bp méretű termékek keletkeztek minden törzs esetében. A 2. PCR termékeinek emésztésekor *MboI* restriktív enzimet alkalmazva 415, 122 és 93 bp méretű termékek, míg a *HphI* enzimmel történő hasítás során 380 és 250 bp-nyi termékek keletkeztek minden törzs esetében.

A 3. PCR termékeinek restriktív hasítását mutatja a 6.3. táblázat. A szekvenciaadatok és a DNS marker alapján az amplicon *AluI*-gyel történő hasítása során az MG TS-11 és az MG X-95 törzseknél 284, 258 és 56 illetve 55 bp termékek keletkeztek. Az MG FS-9 (1226), az MG RCl, az MG Rhigh, az MG Rlow és az MG Rhighm törzsek esetében 317 és 285 bp méretű terméket láttunk. Az MG MK-7, az MG S6 és az MG MS-16 törzsek ampliconjainak emésztése során 285 és 235 bp termék keletkezett, míg az MG M3 esetében 444 és 285 bp. Vagyis ezek alapján az MG TS-11 és az MG X-95 törzsek tartoznak egy csoportba (A), az MG FS-9 (1226), az MG RCl, az MG Rhigh, az MG Rlow és az MG Rhighm törzsek egy másikba (B), az MG MK-7, az MG S6 és az MG MS-16 egy harmadik csoportot alkotnak (C), és külön csoportot alkot az MG M3 (D).

Az *RsaI* enzimet használva ugyanezek a csoportok állíthatók fel. Az MG TS-11 és az MG X-95 törzsek esetében 381, 120, és 97, illetve 96 bp méretű termék keletkezett, míg az MG FS-9 (1226), az MG RCl, az MG Rhigh, az MG Rlow, az MG Rhighm törzseknél 481, 121 bp méretű terméket láttunk. Az MG MK-7, az MG S6 és az MG MS-16 törzsek vizsgálata során 400 és 120 bp terméket figyeltünk meg. Az MG M3 egyedi mintázattal rendelkezett (343, 265, 121 bp).

6.3. táblázat. Az általunk tervezett, *crmA* génre specifikus 3. PCR RFLP analízisének eredménye.

Törzsek	Amplikon mérete (bp)	<i>AluI</i>	<i>RsaI</i>
MI 4229	-	-	-
MG F	-	-	-
MG TS-11	598	284, 258, 56	381, 120, 97
MG MK-7	520	285, 235	400, 120
MG S6	520	285, 235	400, 120
MG MS-16	520	285, 235	400, 120
MG FS-9 (1226)	602	317, 285	481, 121
MG X-95	597	284, 258, 55	381, 120, 96
MG RCI	602	317, 285	481, 121
MG Rhigh	601	317, 285	481, 121
MG Rlow	602	317, 285	481, 121
MG Rhighm	602	317, 285	481, 121
MG M3	729	444, 285	343, 265, 121

A 4. PCR termékeinek RFLP analízise során amennyiben *MboI* restriktív enzimet használtunk, 271, 213, 200 és 90 bp méretű termékek, míg a *RsaI* enzimmel történő emésztést követően 609, 96 és 69 bp méretű termékek keletkeztek a vizsgált törzsek esetében.

Az 5. PCR termékeinek RFLP analízisét 6.4. táblázat foglalja össze. A PCR termék *MboI* restriktív enzimmel történő hasítása során 318, 144, 47 és 46 bp méretű termékek keletkeztek az MG X-95 törzsön (A csoport) kívül minden törzs esetében (B csoport). Az MG X-95 amplikonjának emésztésekor a szekvencia adatok alapján 298, 144, 47 és 41 bp termékeket kaptunk. Ugyanakkor *RsaI* enzimet használva a vizsgált törzsek három fő csoportba oszthatók. Az MI 4229, az MG F, az MG MK-7, az MG FS-9 (1226), az MG RCI, az MG Rhigh, az MG Rlow, az MG Rhighm és az MG M3 törzsek esetében 341, 189 és 25 bp méretű termék keletkezett (I/1 csoport), az MG TS-11 esetében a hasított termékek mérete 337, 189 és 25 bp volt (I/2 csoport). Az I csoport felosztását két alcsoporttá az azonos RFLP mintázat mögött rejlő eltérő hasítási hely indokolja. Az MG S6 és az MG MS-16 amplikonjainak hasítása során 341, 165 és 49 bp méretű terméket kaptunk (II csoport), míg az MG X-95 esetében a hasított termékek mérete 321, 184 és 25 bp volt (III csoport).

6.4. táblázat. Az általunk tervezett, *crmA* génre specifikus 5. PCR RFLP analízisének eredménye.

Törzsek	Amplikon mérete (bp)	<i>Mbo</i> I	<i>Rsa</i> I
MI 4229	555	318, 144, 47, 46	341, 189, 25
MG F	555	318, 144, 47, 46	341, 189, 25
MG TS-11	551	314, 144, 47, 46	338, 189, 25
MG MK-7	555	318, 144, 47, 46	341, 189, 25
MG S6	555	318, 144, 47, 46	341, 165, 49
MG MS-16	555	318, 144, 47, 46	341, 165, 49
MG FS-9 (1226)	555	318, 144, 47, 46	341, 189, 25
MG X-95	530	298, 144, 47, 41	321, 184, 25
MG RCI	555	318, 144, 47, 46	341, 189, 25
MG Rhigh	555	318, 144, 47, 46	341, 189, 25
MG Rlow	555	318, 144, 47, 46	341, 189, 25
MG Rhighm	555	318, 144, 47, 46	341, 189, 25
MG M3	555	318, 144, 47, 46	341, 189, 25

A 6.2. - 6.4. táblázatok alapján az MI 4229 törzs esetében a *crmA* gén (AE016967) csupán 2602-3156 bp-ig terjedő szakaszát sikerült kimutatni, melyek a legtöbb MG törzsszel (az MG F, az MG TS-11, az MG MK-7, az MG FS-9 (1226), az MG RCI, az MG Rhigh, az MG Rlow, az MG Rhighm és az MG M3 törzsekkel) az RFLP alapján hasonló mintázatot mutattak.

Az MG F vakcina törzs esetében a *crmA* gén 40-719 bp-ig, valamint a 2602-3156 bp-ig terjedő szakaszát mutattuk ki. Ezek a szakaszok a többi MG törzsszel hasonló szekvenciájúak voltak, csupán az utóbbi amplikon *Rsa*I enzimmal történő hasítása során kapott termék különbözött az MG MS-16, az MG S6 és az MG X-95 törzsekétől.

Az MG TS-11 törzset vizsgálva kiderült, hogy az MG FS-9 (1226), az MG X-95, az MG RCI, az MG Rhigh, az MG Rlow, az MG Rhighm és az MG M3 törzsekhez hasonlóan az adott gén egészét kimutattuk. Ugyanakkor a restriktációs mintázat alapján a többi törzstől az 1263-1864 bp-ig, valamint a 2602-3156 bp-ig terjedő szakaszokon különbözik. Az első említett szakasz tekintetében az *Alu*I és *Rsa*I enzimet használva az MG TS-11 mintázata az MG X-95 kivételével minden törzstől különbözött. A *crmA* gén 2602-3156 bp-ig terjedő szakasza esetében *Rsa*I restriktációs enzimet használva a kapott mintázat különbözött az MG MS-16, az MG S6 és az MG X-95 törzsekétől.

Az MG MK-7, MG MS-16 és az MG S6 törzsek közül egyikben sem mutattuk ki a *crmA* gén 683-1312 bp-ig terjedő szakaszát. A gén első szakasza a PCR és RFLP alapján hasonlóan mutatkozott a többi törzséhez. A 3. PCR amplikonjának *Alu*I és *Rsa*I enzimekkel történő

hasítása során az említett törzsek hasonló mintázatot mutattak, viszont az összes többi MG törzstől különböztek. A 4. PCR amplikonjai ugyancsak hasonlóak voltak az összes törzsben. A gén 2602-3156 bp-ig terjedő szakaszán *RsaI* enzimet használva az MG MS-16 és az MG S6 hasonló képet mutatott, míg az MG MK-7 a többi vizsgált törzs mintázatával mutatott hasonlóságot.

Az MG FS-9 (1226) vizsgálatakor a *crmA* gén egészét kimutattuk. Az 1. és a 2. PCR termékei és a restrikciós hasítás utáni fragmentjei a többi törzséhez hasonlítottak. A 3. PCR során keletkezett amplikont *AluI* és *RsaI* restrikciós enzimmel hasítva a mintázat az MG RCl, az MG Rhigh, az MG Rlow és az MG Rhighm törzsekéhez volt hasonló. A 4. PCR által felszaporított génszakasz ugyancsak a többi törzséhez volt hasonló. A gén 2602-3156 bp között felszaporított szakaszát *RsaI* enzimmel vizsgálva az MG FS-9 (1226) az MG MS-16, az MG S6 és az MG X-95 törzsek kivételével a többi törzshöz mutatott hasonlóságot.

Az 1., 2. és 4. PCR amplikonjait és RFLP termékeit vizsgálva az MG X-95 sem mutatott különbséget azokhoz a törzsekhez képest, melyekben ezek a szakaszok felszaporíthatók. A *crmA* gén 1263-1864 bp-ig terjedő szakaszát *AluI* és *RsaI* enzimekkel vizsgálva az MG X-95 mintázata az MG TS-11 vakcina törzséhez hasonló. Ugyanígy, az MG TS-11-hez hasonló, mégis egyedi mintázat figyelhető meg az 5. PCR által felszaporított és *RsaI*-gyel hasított termékek esetén is.

Az MG RCl, az MG Rhigh, az MG Rlow és az MG Rhighm törzsek a *crmA* gén teljes vizsgált szakaszán mind a PCR-t, mind pedig az RFLP-t használva hasonlóknak bizonyultak.

Az MG M3 törzs ugyancsak hasonlóságot mutatott a *crmA* gén 1., 2. és 4. PCR által felszaporított amplikonokat és restrikciós termékeket vizsgálva a többi törzssel (amelyekben ezek a szakaszok felszaporíthatók). A 3. PCR termékét mind *AluI*, mind pedig *RsaI* enzimmel hasítva egyedülálló mintázatot kaptunk. Ugyanakkor az 5. PCR termékének *RsaI*-gyel történő hasítását követően a kapott termék csupán az MG MS-16, az MG S6 és az MG X-95 törzsekétől különbözött.

c.) *crmB* génre specifikus PCR és RFLP eredménye

A *crmB* gén jellemzésére négy PCR-t terveztünk. Az alkalmazott primerek segítségével az MI 4229 és az MG F törzsek egyikében sem mutattuk ki a *crmB* gén egyik szakaszát sem.

Az 1. PCR során a keletkezett termék 575 bp, a 2. PCR során 736 bp, a 3. PCR során 794 bp és a 4. PCR során 655 bp a többi törzs esetében.

Az 1. PCR termékeinek *VspI* enzimmel történő emésztéskor 225, 164, 98 és 88 bp méretű szakasz keletkezett minden törzs esetében, míg a *HphI* enzim használata során a kapott termékek mérete egységesen 362 és 213 bp volt, vagyis a PCR és a restrikciós vizsgálatok során a törzsek között nem találtunk különbséget.

A 2. PCR termékeinek RFLP analízise során a PCR termékeket akár *FokI*, akár *RsaI* enzimmel hasítva a törzsek között nem mutatkozik különbség (568 és 168 bp illetve 393 és 343 bp).

A 3. PCR termékeit emésztve csakúgy, mint a 2. PCR során keletkezett amplikonok esetében, jelen esetben a *HaeIII* és *RsaI* enzimekkel hasítva a törzsek között itt sem mutatkozott különbség (488 és 306 bp, illetve 454, 249 és 91 bp).

A 4. PCR termékeinek RFLP mintázata ugyancsak egységes. A *FokI* enzimmel történő emésztéskor 258, 220 és 177 bp méretű szakasz keletkezett, míg a *VspI* enzim használata során a kapott termékek mérete 209, 158, 120, 103 és 65 bp volt, vagyis a törzsek között ebben az esetben sem találtunk különbséget.

d.) *crmC* génre specifikus PCR és RFLP eredménye

A *crmC* gén vizsgálata során öt PCR-t terveztünk. A PCR reakciók (1.-5.) esetében a törzsek amplikonjai között nem láttunk méretbeli különbséget. A szekvencia adatok és a DNS marker alapján az 1. PCR során a keletkezett amplikon mérete 647 bp volt, kivéve az MG TS-11 törzset (642 bp), az MG Rhigh törzset (643 bp) és az MG M3 törzset (644 bp) (8. ábra). A 2. PCR során 500 bp méretű termékek keletkeztek, viszont a fent említett három törzs esetében az amplikonok mérete 498 bp volt (9. ábra). Ugyancsak a szekvencia adatok alapján a 4. PCR során keletkezett termék mérete az MG TS-11 és az MG X-95 törzsek kivételével 595 bp. Ezen két törzs esetében 594 bp méretű amplikonokat kaptunk (10. ábra). A 3. és az 5. PCR során kapott termékek mérete egységesen 569 illetve 616 bp volt.

Az 1. PCR során keletkezett termékeket *AluI* és *HphI* enzimekkel emésztettük. Az RFLP során használt DNS marker és a szekvencia adatok alapján az *AluI* enzim használatakor a 647 bp amplikonból az MG TS-11 törzset kivéve 350 és 297 bp méretű termék keletkezett (A csoport). Ugyanebbe a csoportba tartoznak az MG Rhigh és az MG M3 törzsek is. Az emésztést követően ezen törzsek esetében 350 és 293 bp (MG Rhigh), illetve 350 és 294 bp (MG M3) méretű fragmentek keletkeztek, amelyek mintázatbeli különbséget nem jelentenek. Az MG TS-11 törzs esetében az emésztett termékek mérete 292, 223 és 127 bp volt (B csoport). Ugyanakkor a szekvencia adatok alapján a *HphI* emésztése során az MI 4229, az MG F és az MG X-95 törzsek esetében 362 és 280 bp, az MG TS-11 törzs esetében pedig 362 és 280 bp méretű termékeket kaptunk (I csoport). A többi törzs (MG MK-7, MG S6, MG MS-16, MG FS-9 (1226), MG RCl, MG Rlow és MG Rhighm) vizsgálatakor a keletkezett termékek mérete 280, 194 és 173 bp méretű (az MG Rhigh-nál 280, 194 és 169bp, míg az MG M3-nál 280, 194 és 170 bp) volt (II csoport).

A 2. PCR termékeit *AluI* és *RsaI* enzimekkel emésztettük. A DNS marker és a szekvencia adatok alapján az *RsaI* enzimet használva a törzseknél 267 és 233 bp-nyi termék keletkezett. Az MG TS-11, az MG Rhigh és az MG M3 törzseknél 267 és 231 bp volt a fragmentek mérete, amely nem jelenik meg mintázatbeli különbségként. Ugyanakkor az *AluI* enzim esetében az MG TS-11 törzset emésztve egyedülálló módon 326, 122 és 50 bp méretű termékeket láttunk (A csoport). A többi törzs a 377 és 123 bp-nyi fragmentet adott (az MG Rhigh és az MG M3 pedig 375 és 123 bp méretűt) (B csoport). Vagyis ezen a génszakaszon

az MG TS-11 vakcina törzs restrikciós mintázata az összes többi vizsgált törzsetől különbözik.

A 3. PCR amplikonjainak emésztésekor az 569 bp méretű amplikont a *HphI* enzim 337 és 232 bp-nyi, a *VspI* enzim pedig 320 és 249 bp-nyi termékekre hasította minden törzs esetében.

A 4. PCR amplikonjainak emésztését *HphI* és *FokI* enzimekkel végeztük. A *HphI* enzim működése során 279, 226 és 90 bp terméket kaptunk minden törzs esetében (az MG TS-11 és az MG X-95 törzseknél a fragmentek mérete a szekvencia adatok alapján 279, 225 és 90 bp volt). Ugyanakkor a *FokI* enzim használatakor az MG X-95 törzs esetében 329, 204 és 61 bp terméket kaptunk (A csoport) ellentétben a többi törzstől, ahol 390 és 205 bp termék keletkezett (B csoport).

Az 5. PCR amplikonjának *HpaI* enzimmel történő emésztése során kivétel nélkül 335, 214 és 67 bp méretű terméket kaptunk. Amennyiben az amplikon emésztéséhez *VspI* enzimet használtunk, a termékek mérete 421, 162 és 33 bp volt minden törzs esetében.

e.) *gapA* génre specifikus PCR és RFLP analízis eredménye

- A Kleven által javasolt primerek segítségével két PCR-t végeztünk. Az 1. PCR során a törzsek esetében egységesen 979 bp termék keletkezett, a 2. PCR során pedig 331 bp termék jelent meg minden törzs esetén.

Az 1. PCR amplikonjait *PvuII*, illetve *VspI* restrikciós enzimekkel emésztettük. Első esetben a törzsek mindegyikénél 570 és 409 bp méretű terméket kaptunk. *VspI* enzimet használva minden törzs esetében az emésztett termékek mérete 593 és 386 bp volt.

A 2. PCR termékeinek emésztéséhez *MboI* és szintén *VspI* enzimet használtunk. Míg utóbbi enzim alkalmazásakor minden törzs esetében 148, 126 és 57 bp méretű fragmenteket kaptunk, addig az *MboI* emésztése során kétféle mintázatot kaptunk. Az MI 4229, az MG F, az MG TS-11, az MG MK-7, az MG S6, az MG MS-16 és az MG X-95 törzsek esetében 250 és 81 bp termék keletkezett (A csoport). Az MG FS-9 (1226), az MG RCl, MG Rhigh, az MG Rlow, az MG Rhighm és az MG M3 törzsek esetében pedig 189, 81 és 61 bp méretű termékeket kaptunk (B csoport).

- Az általunk tervezett primerek segítségével végzett PCR-ek eredményeit a 6.5. táblázat foglalja össze. A táblázat alapján az MI 4229 esetén az 1., a 4. és a 6. PCR során kaptunk termékeket, vagyis a gén 41-711 bp-ig, 1878-2528 bp-ig és a 2849-3360 pb-ig terjedő szakaszai (671, 651 és

512 bp termékekkel) amplifikálódtak. Az MG F törzs esetében a 4. PCR során (a gén 1878-2528 bp-ig terjedő szakaszán) nem kaptunk amplikont.

A többi törzs mindegyikének vizsgálata során egységesen 671, 718, 690, 651, 528 és 512 bp termék keletkezett a hat PCR reakció során. A szekvencia adatok alapján az MG TS-11 esetében 648 bp, az MG Rhigh és az MG M3 esetében pedig 650 bp termékek keletkeztek a 4. PCR során (11. ábra).

6.5. táblázat. Az általunk tervezett, *gapA* génre specifikus PCR reakciók eredményei.

Törzsek	A termék mérete (bp)					
	1 PCR	2 PCR	3 PCR	4 PCR	5 PCR	6 PCR
MI 4229	671	-	-	651	-	512
MG F	671	718	690	-	528	512
MG TS-11	671	718	690	648	528	512
MG MK-7	671	718	690	651	528	512
MG S6	671	718	690	651	528	512
MG MS-16	671	718	690	651	528	512
MG FS-9 (1226)	671	718	690	651	528	512
MG X-95	671	718	690	651	528	512
MG RCI	671	718	690	651	528	512
MG Rhigh	671	718	690	650	528	512
MG Rlow	671	718	690	651	528	512
MG Rhighm	671	718	690	651	528	512
MG M3	671	718	690	650	528	512

Az 1. PCR amplikonjának restrikciós emésztésekor akár a *RsaI*, akár a *VspI* enzimeket alkalmaztuk, a törzsek mintázatai között nem találtunk különbséget. Első esetben 494 és 177, második esetben 426 és 245 bp méretű termékek keletkeztek.

Ugyanez vonatkozik a 2. PCR restrikciós emésztésére is. A *HpaI* restrikciós enzim használatakor 232, 216, 168 és 102 bp termék keletkezett minden törzs esetében. Ugyancsak egységesen 614 és 104 bp méretű terméket kaptunk a *MboI* enzim alkalmazása során.

Hasonlóan az 1. és a 2. PCR RFLP analíziséhez, a 3. PCR amplikonjainak emésztése során sem találtunk a törzsek között eltérő mintázatot. A *HphI* enzimet használva 527 és 163 bp-nyi termék, míg a *PvuII*-t használva 455 és 235 bp-nyi termék keletkezett minden vizsgált törzs esetében.

A 4. PCR ampliconjainak emésztése során a DNS marker és a szekvencia adatok alapján *MboI*-et alkalmazva az MG TS-11 vakcina törzs esetében 294, 178 és 176 bp méretű termékek keletkeztek (A csoport). Ettől eltérő mintázatot kaptunk az összes többi MG törzs esetében (243, 229 és 179 bp, illetve 243, 229 és 178 bp az MG Rhigh és az MG M3 törzseknél, B csoport). Az MI 4229 törzs mintázata szintén különbözött a többi törzsetől (400, 180 és 71 bp, C csoport). A *VspI* enzimet használva a törzsek restrikciós mintázatai között nem találtunk különbséget, 578 és 73 bp méretű termékek keletkeztek (az MG Rhigh és az MG M3 törzseket tekintve 578 és 72 bp).

Az 5. PCR termékeinek restrikciós emésztését követően az alábbi eredményeket kaptuk. Akár a *HphI*-et, akár az *RsaI*-et használtuk az RFLP során, a törzsek mintázatai között nem mutatkozott különbség (356, 98 és 74 bp, illetve 379 és 149 bp).

A 6. PCR restrikciós emésztését követően sem találtunk a vizsgált törzsek között különbséget, mivel a *PvuII*-t használva 420 és 92 bp, a *VspI*-et használva pedig 322 és 190 bp termékek keletkeztek.

f.) *mgc2* PCR és RFLP analízis

- A Kleven által javasolt primerek, az általunk módosított PCR, és az elvégzett RFLP az alábbi eredménnyel zárult. A PCR reakció során 821 bp méretű termék keletkezett. Az MG X-95 törzs ampliconját *PvuII* enzimmal hasítva 411 és 410 bp termék, míg *VspI*-gyel hasítva 450 és 371 bp termék keletkezett (A csoport). A többi törzs esetében (B csoport) eltérő mintázatot kaptunk: *PvuII* restrikciós enzimet használva 456 és 365 bp-nyi termék, *VspI*-et használva pedig 418 és 403 bp termék keletkezett.

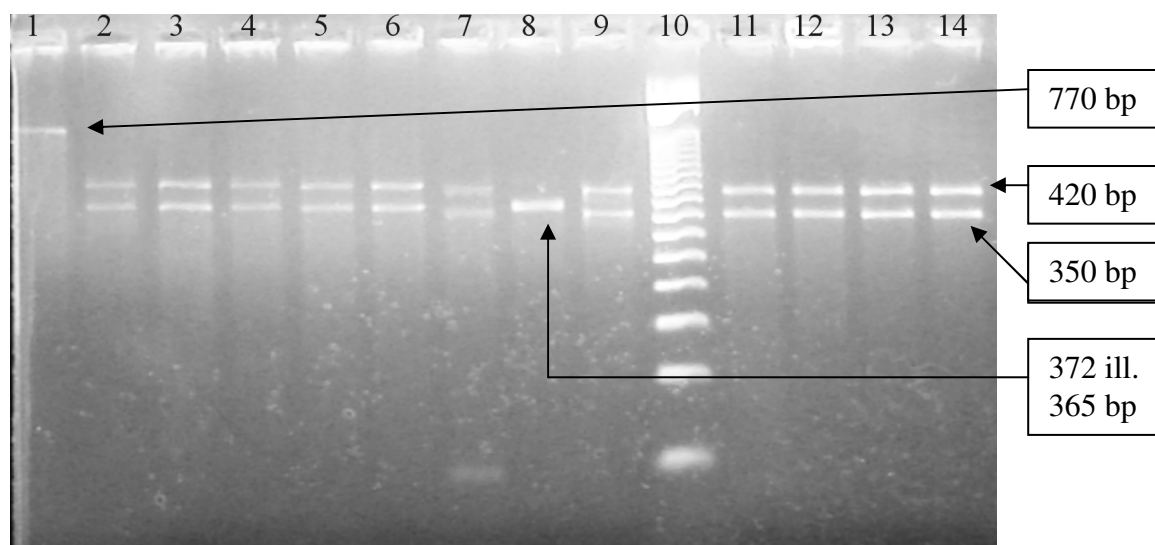
- Az adott gén általunk tervezett PCR-RFLP vizsgálatok eredményeit a 6.6. táblázat tartalmazza.

A szekvencia adatok és a DNS marker alapján a PCR során az MG X-95 törzs esetében 737 bp méretű termék, az MG TS-11 törzs esetében 800 bp termék, míg a többi törzs esetében 770 bp termék keletkezett (12. ábra).

A táblázat alapján *HaeIII* enzimet használva nem hasította az MG MK-7, MG MS-16 és MG S6 törzsek ampliconjait, így ezek a törzsek egy csoportba sorolhatók (A csoport). Az MG F

törzs amplikonjának hasítása során 545 és 225 bp méretű termék (B csoport), míg az MG X-95 törzs esetében 488 és 249 bp méretű termék keletkezett (C csoport). Az MG TS-11 amplikonjának emésztése során 488 és 312 bp terméket (D csoport), a többi törzs esetében pedig a restrikciós hasításakor 458 és 312 bp-nyi terméket kaptunk (E csoport).

A *PvuII* enzimmel történő emésztést a 3. ábra mutatja. A keletkezett csoportok az alábbiak. MI 4229: I csoport, MG X-95: II csoport, MG TS-11: III csoport és a többi törzs: IV csoport.



3. ábra. Az *mgc2* génre specifikus, általunk tervezett PCR amplikonjának *PvuII* restrikciós enzimmel történő emésztése. 1: MI, 2: MG F, 3: MG TS-11, 4: MG MK-7, 5: MG MS-16, 6: MG S6, 7: MG FS-9, 8: MG X-95, 9: MG RCl, 10: DNS marker, 11: MG Rhigh, 12: MG Rlow, 13: MG Rhighm, 14: MG M3.

A *VspI* restrikciós enzim ugyancsak nem emésztette az MI 4229-t, de emellett az MG F törzset sem, valamint a *HaeIII*-hoz hasonlóan az MG MK-7, az MG MS-16 és MG S6 törzs esetében sem kaptunk hasított terméket (1. csoport). Az MG TS-11 amplikonjának hasítása során 431 és 369 bp termék keletkezett (2. csoport), az MG X-95 hasítása során pedig 431 és 306 bp (3. csoport). A többi törzs esetében 401 és 369 bp-nyi termék keletkezett (4. csoport).

6.6. táblázat. Az *mgc2* génre specifikus, általunk tervezett PCR és RFLP eredményei.

Törzsek	Amplikon mérete (bp)	<i>HaeIII</i>	<i>PvuII</i>	<i>VspI</i>
MI 4229	770	458, 312	N	N
MG F	770	545, 225	420, 350	N
MG TS-11	800	488, 312	435, 365	431, 369
MG MK-7	770	N	420, 350	N
MG S6	770	N	420, 350	N
MG MS-16	770	N	420, 350	N
MG FS-9 (1226)	770	458, 312	420, 350	401, 369
MG X-95	737	488, 249	372, 365	431, 306
MG RCI	770	458, 312	420, 350	401, 369
MG Rhigh	770	458, 312	420, 350	401, 369
MG Rlow	770	458, 312	420, 350	401, 369
MG Rhighm	770	458, 312	420, 350	401, 369
MG M3	770	458, 312	420, 350	401, 369

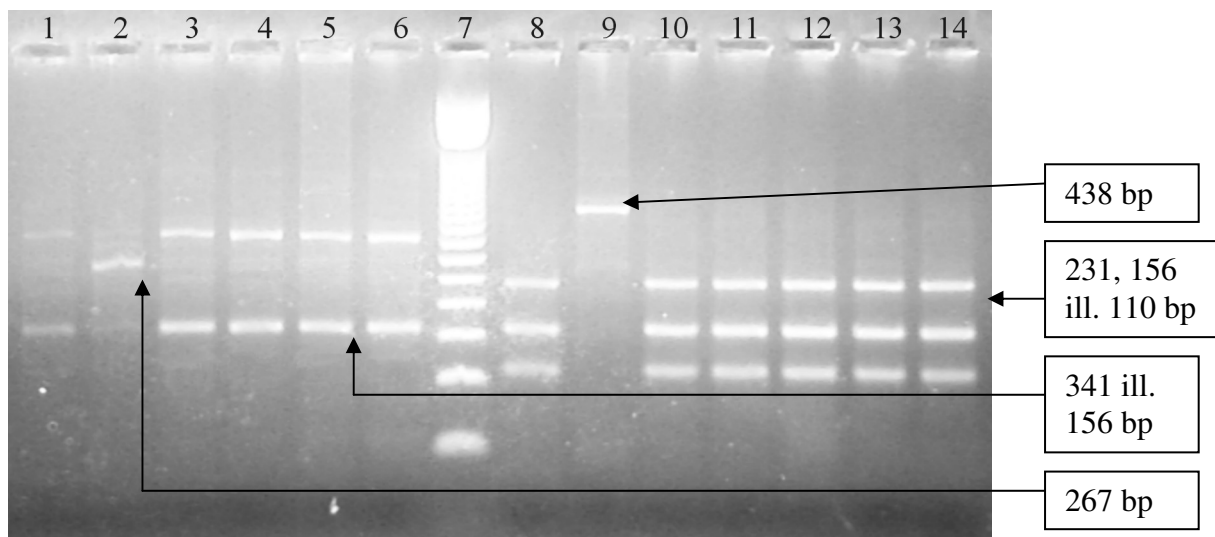
g.) *LP* génre (AF075588) specifikus PCR és RFLP analízis

A Nascimento és mtsai. (1991) által tervezett PCR és az általunk tervezett RFLP analízis eredményeként 731 bp termék keletkezett minden vizsgált törzs esetében. A *FokI*-el történt emésztés hatására 435, 206 és 90 bp termék, míg a *HphI* enzim hatására 541 és 190 bp termék keletkezett, így ezen vizsgálatok alapján a törzsek egységesnek bizonyultak.

h.) *pvpA* génre (AE016969) specifikus PCR és RFLP analízis

A *pvpA* gén jellemzésének PCR és RFLP eredményei Liu és mtsai. (2001) munkáját módosítva a 6.7. táblázatban láthatóak. A táblázatból látszik, hogy az MG F törzs esetében 267 bp, az MG X-95 törzs esetében 438 bp, az MG Rhigh-nál 499 bp, az MG M3-nál 500 bp, többi vizsgált törzs esetében pedig 497 bp méretű termék keletkezett (13. ábra).

Az amplikonokat *AccI* restriktációs enzimmel emésztve az MG F és az MG X-95 törzsek egy csoportba tartoznak, mivel az enzim amplikonjaikat nem emésztette (A csoport). Az MI 4229, az MG TS-11, az MG MK-7, az MG MS-16 és az MG S6 törzsek amplikonjának emésztése során 341 és 156 bp termékeket kaptunk (B csoport). A többi törzs a C csoportba tartozik (231, 156 és 110 bp méretű termékkel, az MG Rhigh esetében ez 231, 157 és 111 bp, az MG M3-nál pedig 231, 158 és 111 bp). Az emésztés képe a 4. ábrán látható.



4. ábra. A *pvpA* génre specifikus, Liu és munkatársai által tervezett (Liu és mtsai. 2001), általunk módosított PCR amplikonjának *AccI* restrikciós enzimmel történő emésztése. 1: MI, 2: MG F, 3: MG TS-11, 4: MG MK-7, 5: MG MS-16, 6: MG S6, 7: DNS marker, 8: MG FS-9, 9: MG X-95, 10: MG RCL, 11: MG Rhigh, 12: MG Rlow, 13: MG Rhighm, 14: MG M3.

A *PvuII* restrikciós enzim nem emésztette az MI 4229 törzset (I csoport), ugyanakkor az MG F törzs esetében 217 és 50 bp méretű emésztett terméket kaptunk (II csoport). Az MG X-95 törzs emésztése során 216, 120, 51 és 51 bp-nyi (III csoport), a többi törzs vizsgálatakor pedig 231, 217 és 49 bp méretű terméket kaptunk (IV csoport) (az MG Rhigh-nál 231, 218 és 50 bp, az MG M3-nál pedig 231, 219 és 50 bp). Amennyiben az emésztést *ScrFI* enzimmel végeztük el, az MG F törzs esetében 193 és 74 bp (1. csoport), az MG X-95 törzs esetében 351, 74 és 13 bp (2. csoport), a többi törzs esetében pedig 240, 171 és 74 és 12 bp méretű fragmenteket láttunk (kivételek MG Rhigh: 240, 171, 75 és 13 bp, valamint MG M3: 240, 171, 76 és 13 bp) (3. csoport). Az eredményeink az *ScrFI* enzimmel történő emésztés kivételével összhangban állnak Liu és munkatársai (2001) által közölt eredményekkel.

6.7. táblázat. A *pvpA* génre specifikus, Liu és munkatársai (2001) által tervezett, általunk módosított PCR és RFLP eredményei.

Törzsek	Amplikon mérete (bp)	<i>AccI</i>	<i>PvuII</i>	<i>ScrFI</i>
MI 4229	497	341, 156	N	240, 171, 74, 12
MG F	267	N	217, 50	193, 74
MG TS-11	497	341, 156	231, 216, 50	240, 171, 73, 13
MG MK-7	497	341, 156	231, 217, 49	240, 171, 74, 12
MG S6	497	341, 156	231, 217, 49	240, 171, 74, 12
MG MS-16	497	341, 156	231, 217, 49	240, 171, 74, 12
MG FS-9 (1226)	497	231, 156, 110	231, 217, 49	240, 171, 74, 12
MG X-95	438	N	216, 120, 51, 51	351, 74, 13
MG RCI	497	231, 156, 110	231, 217, 49	240, 171, 74, 12
MG Rhigh	499	231, 157, 111	231, 218, 50	240, 171, 75, 13
MG Rlow	497	231, 156, 110	231, 217, 49	240, 171, 74, 12
MG Rhighm	497	231, 156, 110	231, 217, 49	240, 171, 74, 12
MG M3	500	231, 158, 111	231, 219, 50	240, 171, 76, 13

A nyolc génre tervezett nagyszámú PCR-RFLP során a törzsek között több esetben nem tudtuk különbséget tenni. Ezért a törzsek megkülönböztetésére, illetve azonosítására alkalmas módszereket összegzésként a 6.8. táblázat mutatja. A táblázatban a PCR-RFLP módszerek mellett azokat a törzseket is feltüntettem, amelyek a referens MG Rlow törzshöz képest eltérő mintázatot mutattak. Ugyanakkor a vizsgált törzsek az alkalmazott módszerektől függően több csoportba is besorolhatóak, de ennek ellenére nem minden módszer alkalmas az MI 4229, valamint az MG F és az MG TS-11 vakcina törzsek elkülönítésére.

6.8. táblázat. Összefoglaló táblázat a különböző RAPD PCR és PCR-RFLP mintázatokat eredményezett módszerekről. **Vastag betű:** jelen munka során kifejlesztett PCR-RFLP, ¹: azon törzsek, melyek a referens MG Rlow törzstől eltérő mintázatot mutattak, ²: a különböző RAPD, valamint a PCR-RFLP mintázatok alapján létrejött Mycoplasma csoportok száma, ³: azok a módszerek, melyek segítségével az MI 4229, valamint az MG F és MG TS-11 vakcina törzsek a többi vizsgált törzstől egyértelműen megkülönböztethetőek.

Célgén/PCR	PCR száma	Restriktációs enzim	Eltérő mintázat az MG Rlow törzstől ¹	Csoportok száma ²	Azonosítható ³		
					MI 4229	MG F	MG TS-11
RAPD PCR (Fan és mtsai. 1995)	-	-	MI 4229, MG F, MG TS-11, MG MK-7, MG S6, MG MS-16	6	+	+	+
RAPD PCR (Charlton és mtsai. 1999b)	-	-	MI 4229, MG F, MG TS-11, MG MK-7, MG S6, MG MS-16, MG X-95	6	+	+	-
<i>recA</i>	4	<i>VspI</i>	MI 4229, MG TS-11, MG MK-7, MG S6, MG MS-16	2	-	-	-
<i>crmA</i>	3	<i>AluI</i>	MI 4229, MG F, MG TS-11, MG MK-7, MG S6, MG MS-16, MG X-95, MG M3	4	-	-	-
		<i>RsaI</i>	MI 4229, MG F, MG TS-11, MG MK-7, MG S6, MG MS-16, MG X-95, MG M3	4	-	-	-
	5	<i>MboI</i>	X-95	2	-	-	-
		<i>RsaI</i>	MG S6, MG MS-16, MG X-95	3	-	-	-
	<i>crmC</i>	1	<i>AluI</i>	MG TS-11	2	-	-
<i>HphI</i>			MI 4229, MG F, MG TS-11, MG X-95	2	-	-	-
2		<i>AluI</i>	MG TS-11	2	-	-	+
4		<i>FokI</i>	MG X-95	2	-	-	-
<i>gapA</i>	4	<i>MboI</i>	MI 4229, MG F, MG TS-11	3	+	+	+
	K2	<i>MboI</i>	MI 4229, MG F, MG TS-11, MG MK-7, MG S6, MG MS-16, MG X-95	2	-	-	-
<i>mgc2</i>	1	<i>HaeIII</i>	MG F, MG TS-11, MG MK-7, MG S6, MG MS-16, MG X-95	5	-	+	+
		<i>PvuII</i>	MI, 4229, MG TS-11, MG X-95	4	+	-	-
	K2	<i>VspI</i>	MI, 4229, MG F, MG TS-11, MG MK-7, MG S6, MG MS-16, MG X-95	4	-	-	+
		<i>PvuII</i>	MG X-95	2	-	-	-
		<i>VspI</i>	MG X-95	2	-	-	-
<i>pvpA</i>	-	<i>AccI</i>	MI, 4229, MG F, MG TS-11, MG MK-7, MG S6, MG MS-16, MG X-95	3	-	-	-
		<i>PvuII</i>	MI 4229, MG F, MG X-95	4	+	+	-
		<i>ScrFI</i>	MG F, MG X-95	3	-	+	-

6.3. A szekvencia analízis eredményei

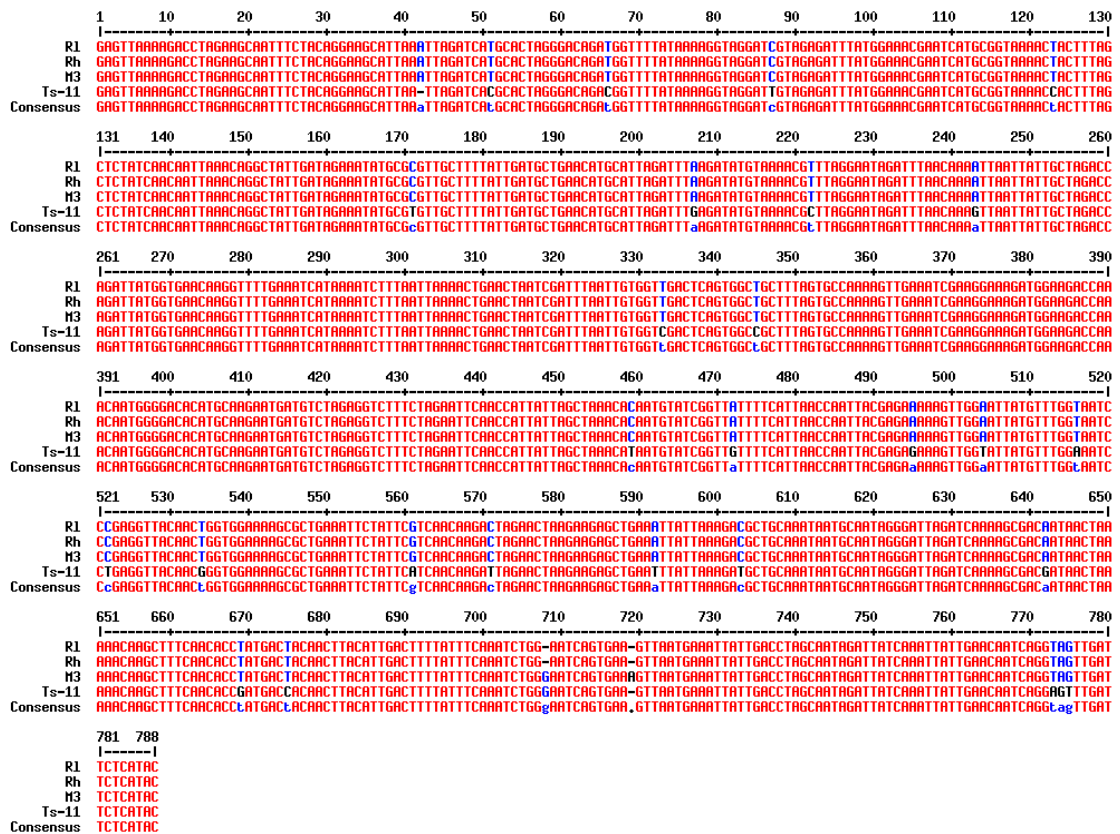
Az egyes törzsek esetében szekvenált génszakaszokat (illetve azok bp-ban megadott hosszát) a 6.9. táblázat mutatja be.

6.9. táblázat. A megszekvenált génszakaszok mérete a vizsgált törzsek esetében. ¹: génbanki adatok alapján, -: nem történt szekvenálás.

Gén	Gén mérete (bp) ¹	A szekvenált génszakasz hossza a vizsgált törzsek esetében (bp)			
		MG TS-11	MG Rhigh	MG M3	MG X-95
<i>recA</i>	1020	786	786	788	-
<i>crmA</i>	3180	598 és 552	602 és 555	729 és 555	597 és 530
<i>crmC</i>	2520	642, 498 és 594	643, 498 és 595	644, 498 és 595	594
<i>gapA</i>	3372	648	650	650	-
<i>mgc2</i>	894	800	770	770	737
<i>pvpA</i>	1149	497	499	500	438

a) *recA* gén (AF443795) szekvencia analízisének eredménye

A *recA* génre specifikus, általunk tervezett PCR termékeit az MG TS-11, az MG Rhigh és az MG M3 törzsek esetében szekvenáltuk. Az illesztett szekvenciák az 5. ábrán láthatóak. A szekvenciák illesztésénél látható, hogy a vizsgált szekvenciák közül leginkább az MG TS-11 szekvenciája mutatott különbséget a többihez képest. Az MG TS-11 szekvenciája az MG Rlow törzshöz képest összesen 29 bázis pozícióban mutatott eltérést, míg az MG M3 esetében 2 volt bázisbeli különbségek száma, az MG Rhigh esetében pedig nem volt különbség az MG Rlow-hoz képest.

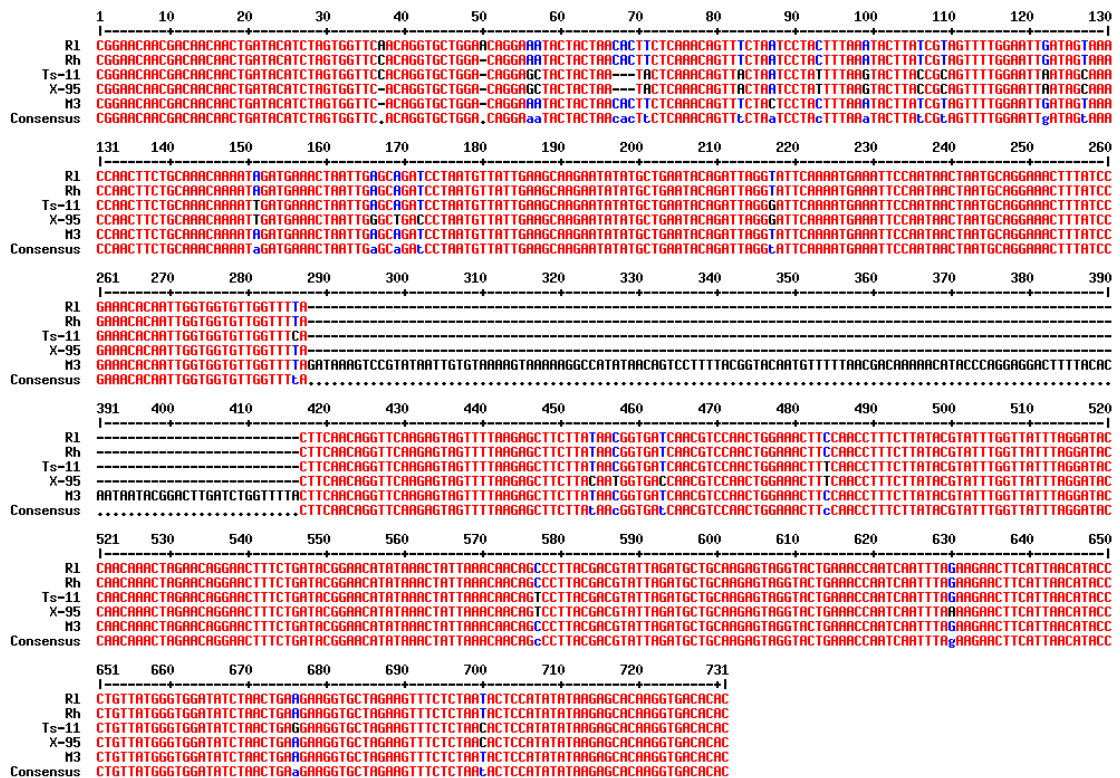


5. ábra. A *recA* génre specifikus, általunk tervezett PCR amplikonjának szekvencia illesztése

b) *crmA* gén (AE016967) szekvencia analízisének eredménye

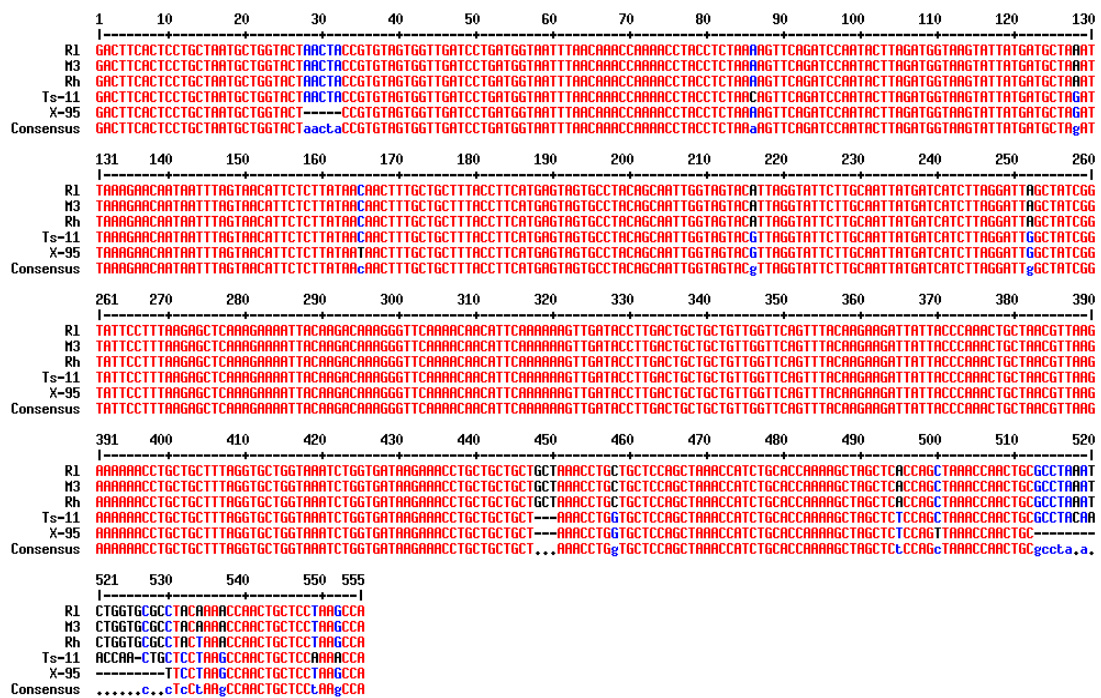
Az MG TS-11, az MG Rhigh, az MG M3 és az MG X-95 törzsek esetében a *crmA* génre specifikus, általunk tervezett 3. és 5. PCR termékeit szekvenáltuk. Az illesztett szekvenciákat a 6. és 7. ábra mutatja.

A 3. PCR amplikonjának illesztése során kiderül, hogy az MG M3 szekvenciája 127 bp méretű inszerciót tartalmaz az MG Rlow törzs szekvenciájához képest, de emellett ugyanezen törzs esetében 3 pontmutációt is megfigyelhetünk. Ugyanakkor az MG X-95 szekvenciája 24, az MG TS-11-é pedig 19 ponton különbözik az MG Rlow szekvenciájától. Az MG Rhigh szekvenciája 2 pontmutációt tartalmaz az MG Rlow-éhoz képest (6. ábra).



6. ábra. A *crmA* génre specifikus, általunk tervezett 3. PCR amplikonjának szekvencia illesztése

Az 5. PCR amplikonjának szekvencia analízise során kiderült, hogy a vizsgált törzsek szekvenciája az 513-537 bp-ig terjedő szakaszon az MG TS-11 törzs esetében nagyfokú varabilitást mutat, míg ennek a szekvenciának egy szakasza az MG X-95 törzs esetében hiányzik, a megmaradt szakasza pedig különbséget mutat az MG Rlow, az MG Rhigh és az MG M3 törzsekhez képest. Ezen kívül az MG TS-11 még több ponton különbözik az MG Rlow törzstől, az MG X-95 szekvenciája pedig két kisebb deléció is tartalmaz. Az MG M3, az MG Rlow és az MG Rhigh szekvenciája teljes mértékben megegyezik (7. ábra).

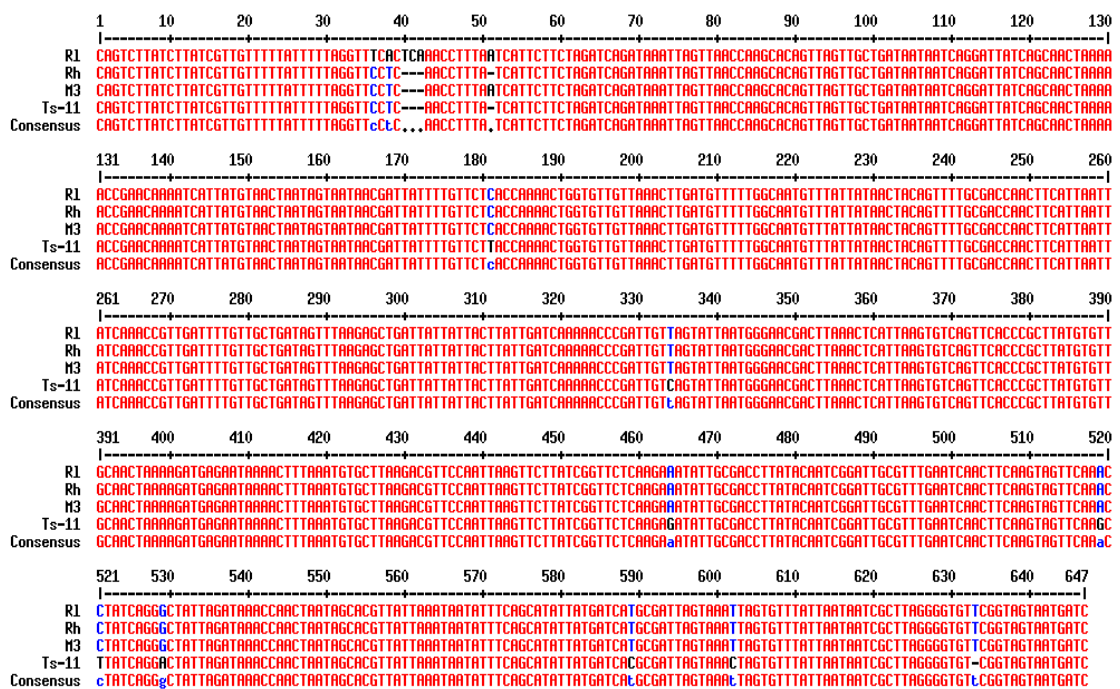


7. ábra. A *crmA* génre specifikus, általunk tervezett 5. PCR amplikonjának szekvencia illesztése

c) *crmC* gén (AE016967) szekvencia analízisének eredménye

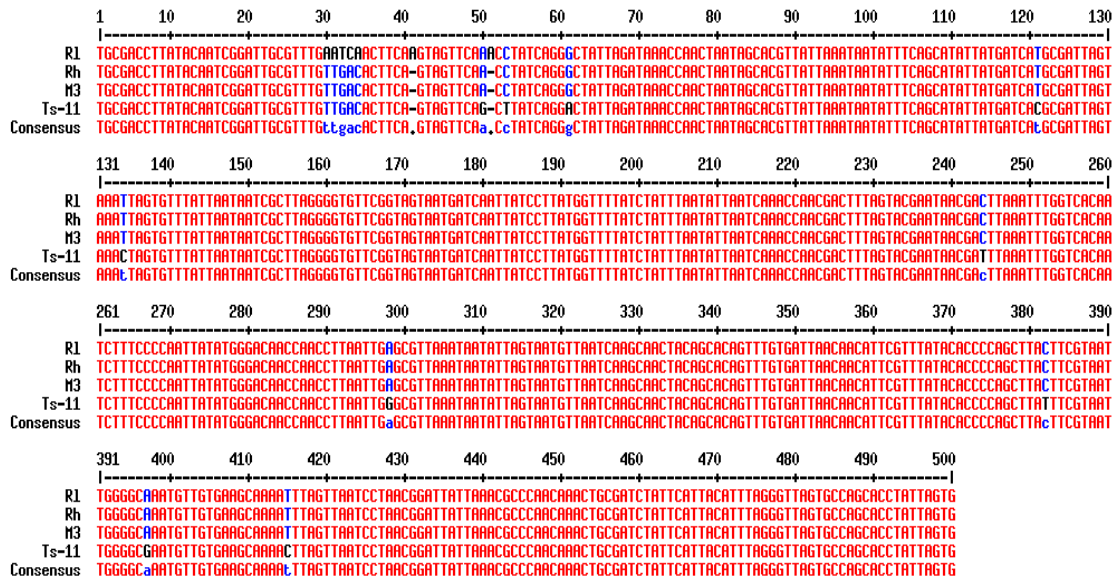
Az MG TS-11, az MG Rhigh és az MG M3 törzsek esetében a *crmC* génre specifikus, általunk tervezett 1., 2. és 4. PCR termékeit, az MG X-95 törzs esetében pedig a 4. PCR termékeit szekvenáltuk. A szekvenciák illesztései a 8., 9. és 10. ábrákon láthatóak.

A *crmC* gén 1. PCR amplikonjának szekvencia analízise során csupán néhány pontmutációban és egy kisebb delécióban különbözött az MG Rlow törzs szekvenciájától a többi vizsgált törzs (8. ábra).



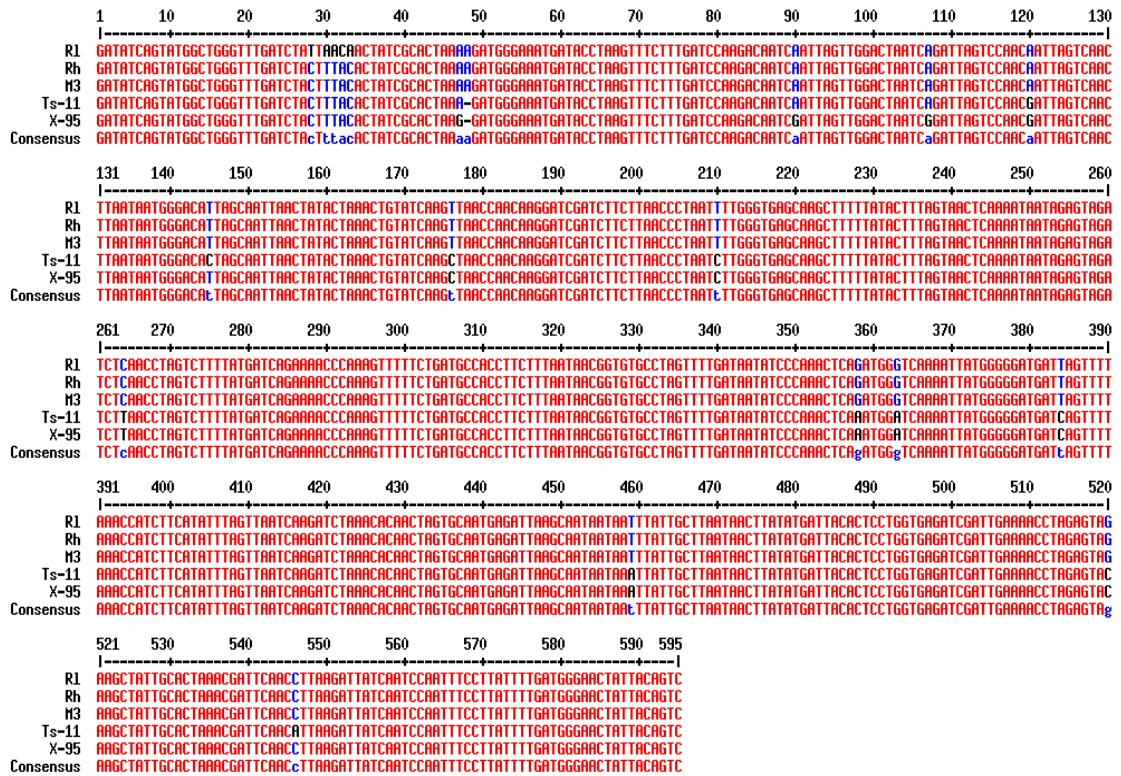
8. ábra. A *crmC* génre specifikus, általunk tervezett 1. PCR amplikonjának szekvencia illesztése

A 2. PCR szekvencia analízise során a 30.-35. pozícióig az MG Rhigh, az MG TS-11 és az MG M3 szekvenciájában eltérés van az MG Rlow-éhoz képest. Ezen kívül az MG TS-11 szekvenciája 11 pontmutációt, az MG M3-é és az MG Rhigh-é 2 pontmutációt tartalmaz az MG Rlow szekvenciájához viszonyítva (9. ábra).



9. ábra. A *crmC* génre specifikus, általunk tervezett 2. PCR amplikonjának szekvencia illesztése

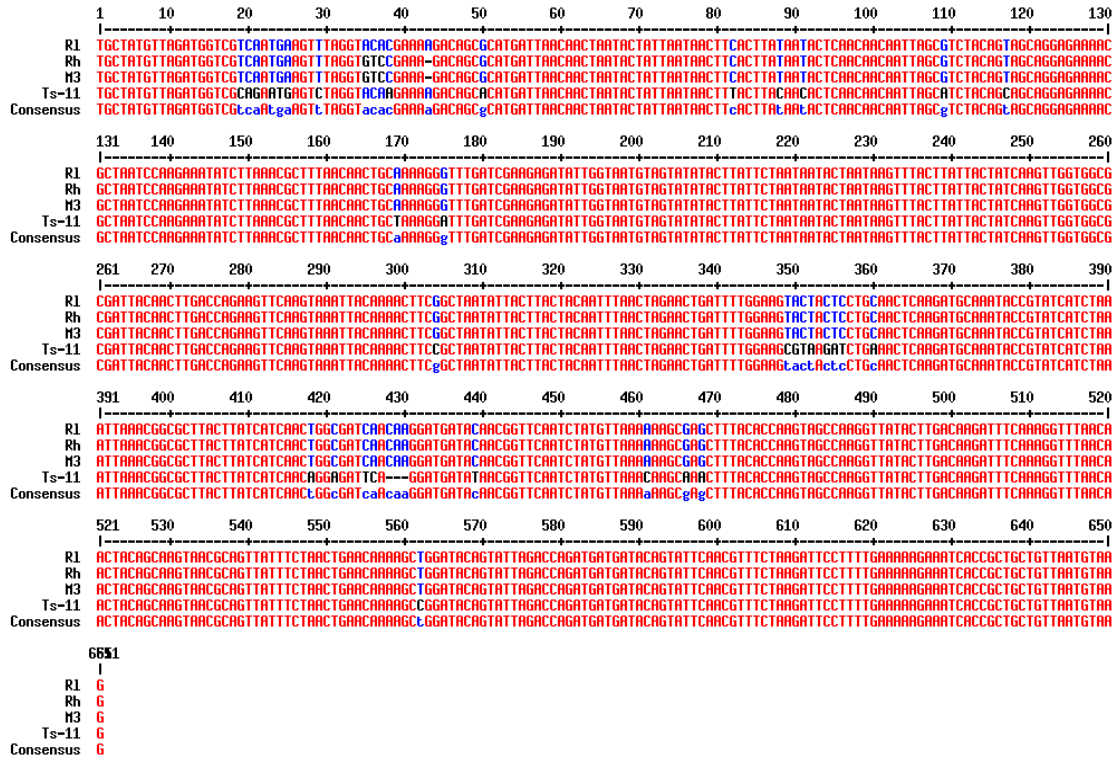
A 4. PCR szekvenciájának vizsgálata során az illesztés alapján a 28.-33. pozícióban szintén különbség látható az MG TS-11, az MG X-95, az MG Rhigh, az MG M3 és az MG Rlow szekvenciája között. Ezen kívül az MG TS-11 és az MG X-95 szekvenciája néhány pontmutációt tartalmaz (10. ábra).



10. ábra. A *crmC* génre specifikus, általunk tervezett 4. PCR amplikonjának szekvencia illesztése

d) *gapA* gén (AE016967) szekvencia analízisének eredménye

Az MG TS-11, az MG Rlow és az MG M3 törzsek esetében a *gapA* génre specifikus, általunk tervezett 4. PCR termékeit szekvenáltuk. A szekvenciák illesztését a 11. ábra tartalmazza. Az ábra alapján a szekvenciákban több variabilis régió is van. A pontmutációk mellett megtalálhatók olyan szakaszok is, ahol egymást követően több bázis is mutációt szenvedett.

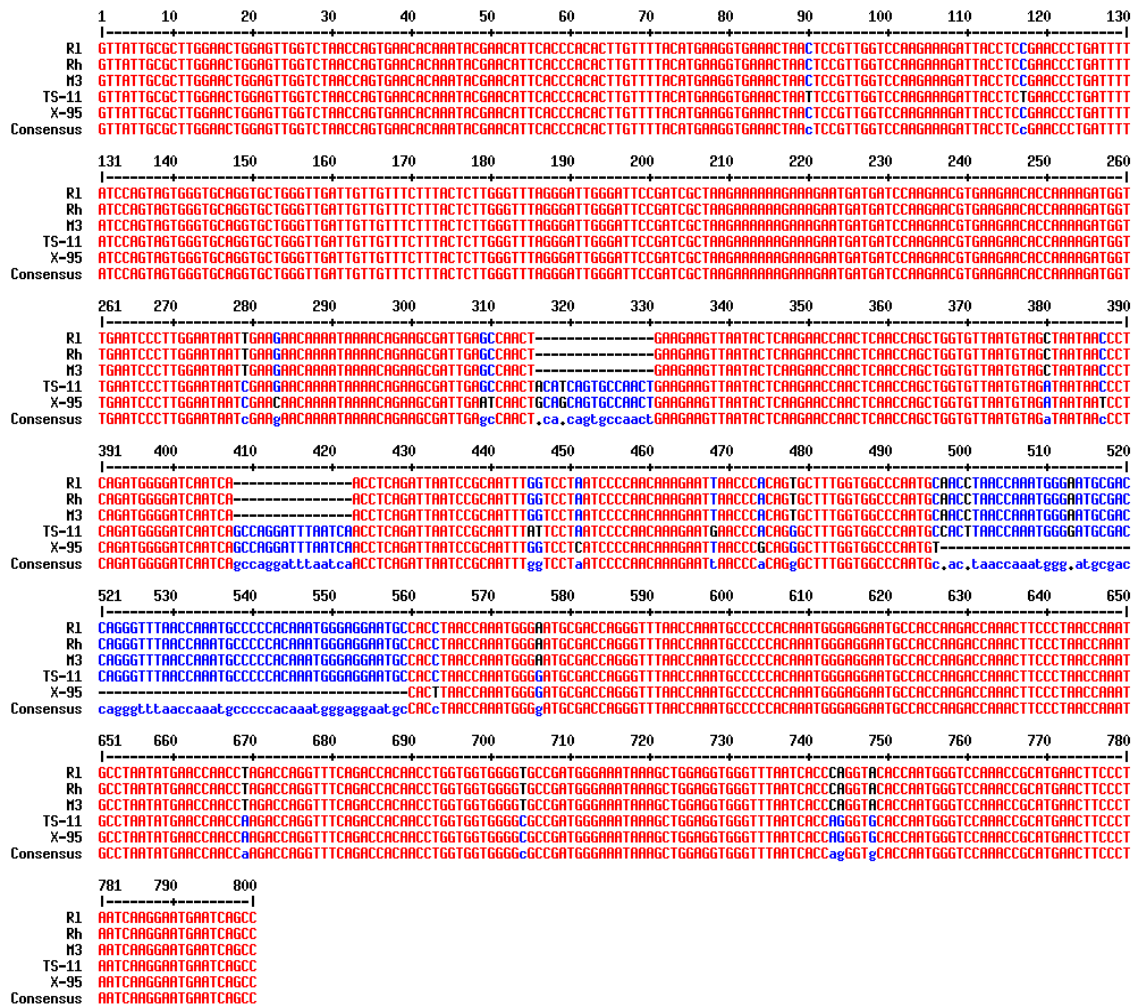


11. ábra. A *gapA* génre specifikus, általunk tervezett 4. PCR amplikonjának szekvencia illesztése

e) *mgc2* (AE016967) gén szekvencia analízisének eredménye

A *mgc2* génre specifikus, általunk tervezett PCR termékeit az MG TS-11, az MG X-95, az MG Rlow és az MG M3 törzsek esetében szekvenáltuk. A szekvencia illesztések a 12. ábrán láthatóak.

Az ábra alapján az *mgc2* általunk vizsgált szekvenciájában a pontmutációkon kívül 3 nagy variabilis régiót különíthetünk el. Az MG TS-11 és az MG X-95 szekvenciájában a 316-320 és a 408-422 bp pozíciókban inszerció jelent meg. Emellett az MG X-95 szekvenciája a 497-560 bp pozícióig delécióit tartalmaz.

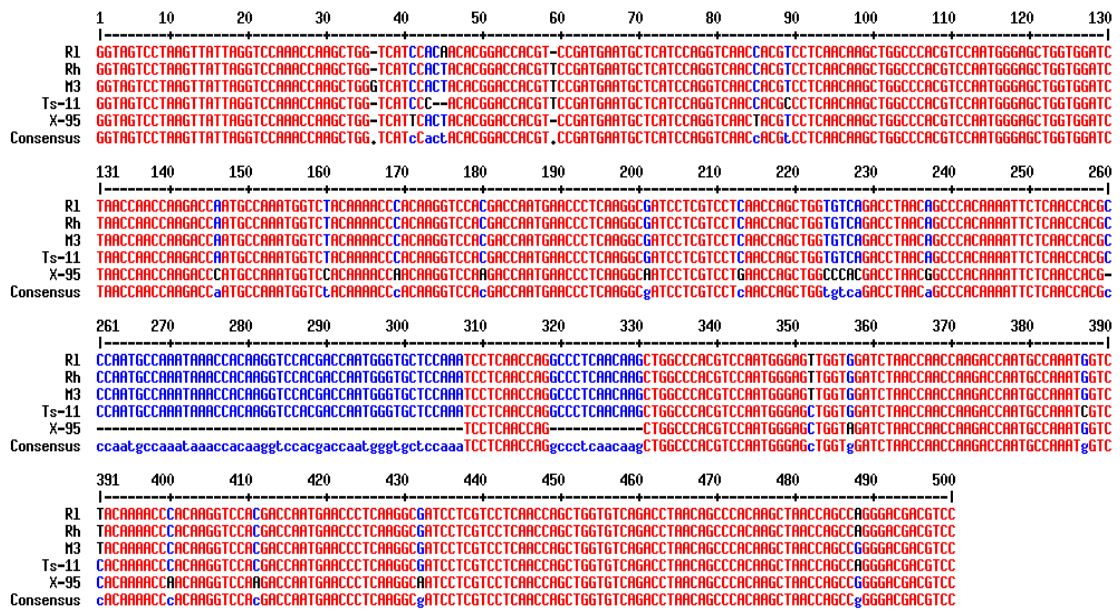


12. ábra. Az *mgc2* génre specifikus, általunk tervezett PCR amplikonjának szekvencia illesztése

f) *pvpA* gén (AE016969) szekvencia analízisének eredménye

A Liu és munkatársai által tervezett (Liu és mtsai. 2001), általunk módosított PCR során keletkezett amplikonokat az MG TS-11, az MG X-95, az MG Rlow és az MG M3 esetében szekvenáltuk. A szekvencia illesztéseket a 13. ábra tartalmazza.

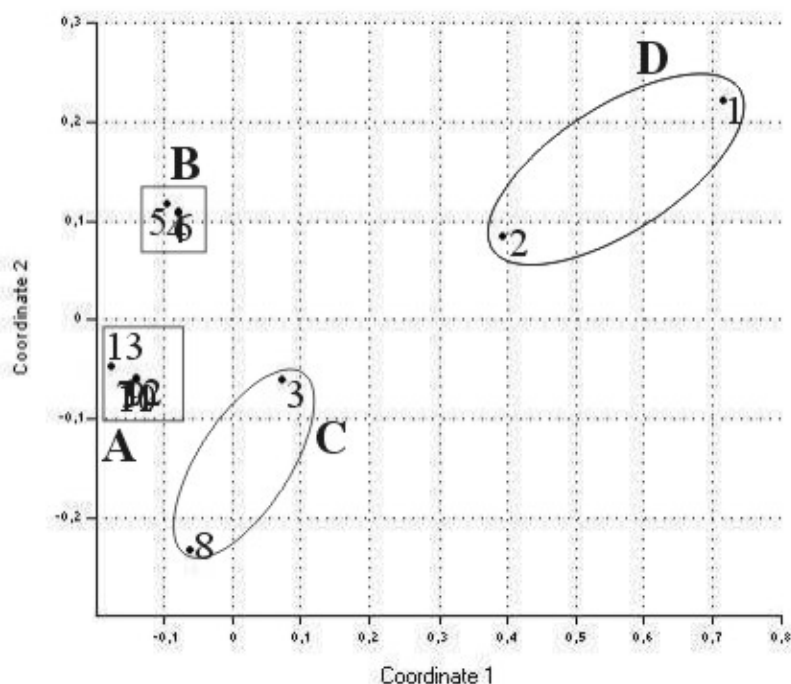
Az ábra alapján látható, hogy a több kisebb méretű variabilis régió (a 41. bp és a 224. bp pozícióktól) és a pontmutációk mellett az MG X-95 szekvenciája a 260-307 bp pozícióban, valamint a 319-330 bp pozícióban egy-egy deléciót tartalmaz.



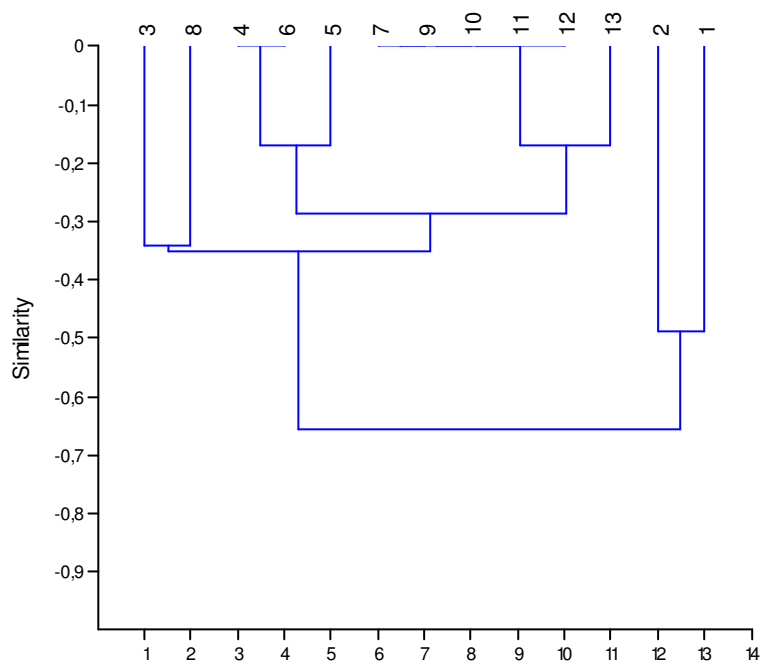
13. ábra. A *pvpA* génre specifikus, Liu és munkatársai (2001) által tervezett, általunk módosított PCR amplikonjának szekvencia illesztése

6.4. Statisztikai eredmények

A statisztikai elemzést az összes vizsgált törzs esetében a RAPD PCR, valamint az összes vizsgált génszakasz PCR és RFLP mintázatai alapján végeztük el. Az ordináció során NMDS-t használtunk Euklideszi távolságot alkalmazva. Az eredmények a 14. ábrán láthatók. A pontok melletti számok a vizsgált törzseket jelzik. Az ábrából látható, hogy az MG FS-9 (1226), MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm és az MG Mhad3 szorosan egymás mellett helyezkedik el, vagyis ezen törzsek közötti PCR- és RFLP-mintázatbeli különbségek minimálisak („A” csoport). Az MG MK-7, az MG S6 és az MG MS-16 szintén egy csoportba sorolhatók, viszont az „A” csoporttól egyértelműen megkülönböztethetőek („B” csoport). Az MG X-95 és az MG TS-11, valamint az MG F és az MI 4229 egy-egy csoportot alkotnak („C” és „D” csoport). Ezt az eredményt a cluster analízis (osztályozás) megerősíti (15. ábra).



14. ábra. Az RFLP mintázatok alapján készített NMDS eredménye. A pontok a vizsgált törzseket jelölik. 1: MI, 2: MG F, 3: MG TS-11, 4: MG MK-7, 5: MG MS-16, 6: MG S6, 7: MG FS-9, 8: MG X-95, 9: MG RCl, 10: MG Rhigh, 11: MG Rlow, 12: MG Rhighm, 13: MG M3.



15. ábra. Az RFLP mintázatok alapján készített osztályozás eredménye. A számok a vizsgált törzseket jelölik. 1: MI, 2: MG F, 3: MG TS-11, 4: MG MK-7, 5: MG MS-16, 6: MG S6, 7: MG FS-9, 8: MG X-95, 9: MG RCl, 10: MG Rhigh, 11: MG Rlow, 12: MG Rhighm, 13: MG M3.

7. Megbeszélés

7.1. A genomon végzett RAPD PCR reakciók eredményeinek megbeszélése

Fan és mtsai. (1995) által tervezett, általunk módosított RAPD PCR segítségével mindkét MG vakcina törzs (MG F és MG TS-11), valamint az MI 4229 is egyértelműen megkülönböztethető a többi MG törzstől és egymástól. Ezeket a primereket használva Fan és munkatársai (1995) szintén különbséget tettek különböző MG izolátumok között.

Charlton és mtsai. (1999b) primereit használva az MG F és az MI 4229 egyértelműen megkülönböztethető a többi vizsgált törzstől, azonban az MG TS-11 vakcina törzs az MG MK-7 és az MG S6 törzsekkel mutat hasonló mintázatot. Charlton ugyancsak különbségeket talált az általa vizsgált MG törzsek között (Charlton és mtsai. 1999b).

Ezek alapján elmondható, hogy az MI 4229, az MG F és az MG MS-16 DNS mintázata mutatja a legnagyobb különbséget egymástól, illetve a többi törzstől, míg az MG FS-9, az MG RCl, az MG Rhigh, az MG Rlow, az MG Rhighm és az MG M3 törzsek DNS mintázata a leginkább hasonló egymáshoz.

7.2. Az egyes génszakaszokra specifikus PCR reakciók és az RFLP eredményeinek megbeszélése

a.) *recA* génre specifikus PCR és az RFLP analízis eredménye

Bencina által tervezett három pár primert (szóbeli közlés) és így három PCR rendszert használva az általunk vizsgált törzsek között nem mutatkozott különbség. Sajnos arra vonatkozóan nincs tudomásunk, hogy a szerző az általa tervezett primereket alkalmazva végzett-e az MG törzsek között ilyen irányú összehasonlítást, és ha igen, akkor a vizsgálatok milyen eredménnyel zárultak. Ugyanakkor amennyiben saját primereket alkalmaztunk, a törzseket két csoportba oszthattuk. A szekvencia adatok alapján az MG TS-11 vakcina törzs szekvenciája különbözött leginkább a többi törzs szekvenciájától. Ez a különbség oka lehet ezen törzs hőérzékenységének.

b.) *crmA* génre specifikus PCR-RFLP eredményének megbeszélése

A *crmA* gén az MG citadherens tulajdonságának vizsgálata során került előtérbe (Troy, 1998; Papazisi és mtsai. 2000, 2002b). A gén szekvenciájában bekövetkező változások következtében az MG elvesztette citadherens képességét. Ugyanakkor a különböző MG törzsek ezen gén alapján történő összehasonlító vizsgálatára eddig nem került sor. Jelen munka során a *crmA* gén alapján végzett összehasonlító vizsgálatokhoz öt PCR-t fejlesztettünk ki. Mindegyik PCR amplikonját RFLP analízisnek vetettük alá. Az MI 4229 törzs esetében a vizsgált gén csupán egy szakaszát mutattunk ki. Ennek alapján a többi génszakasz olyan mértékű változáson mehetett keresztül, hogy azt az általunk tervezett primerek segítségével nem sikerült amplifikálni. Hasonló mondható el az MG F, az MG MK-7, az MG S6 és az MG MS-16 törzsek esetében is, bár ezeknél a törzseknél a *crmA* gén több szakaszát is kimutattuk. Az RFLP mintázatok alapján a gén egyes szakaszai változékonnyabbak a törzsek között, mint mások. A PCR-RFLP eredményeit a szekvencia analízis megerősítette.

c.) *crmB* génre specifikus PCR és RFLP eredményének megbeszélése

Jelenleg az MG R törzsének szekvenciáján kívül sem a *crmB*, sem a *crmC* gén jellemzésére sem állnak rendelkezésre adatok.

A *crmB* génen végzett vizsgálatok során a gén jellemzésére négy PCR-t fejlesztettünk ki. Mindegyik PCR amplikonját RFLP analízisnek vetettük alá. Az MI 4229 és az MG F törzseket egyik PCR-rel sem mutattuk ki, vagyis ezen törzsek esetében a vizsgálni kívánt szekvencia nukleotid sorrendjében jelentős változás mehetett végbe. A többi törzs között nem mutattunk ki a PCR-RFLP mintázatok alapján különbséget.

d.) *crmC* génre specifikus PCR és RFLP eredményének megbeszélése

A *crmC* gén jellemzésére öt PCR-t fejlesztettünk ki. Mindegyik PCR amplikonját RFLP analízisnek vetettük alá. A *crmC* gén egyes fragmentjei variábilisnak bizonyultak, más fragmentek pedig nem mutattak a törzsek között különbséget. Az MG TS-11 vakcina törzs a vizsgált gén több szakaszának szekvenciájában a többi törzstől egyértelműen különbözik. Az elvégzett szekvencia analízis ezt az eredményt megerősítette.

e.) *gapA* génre specifikus PCR és RFLP eredményének megbeszélése

Az Amerikai Egyesült Államokbeli MG izolátumokon a *gapA* és az *mgc2* gén alapján Kleven és mtsai. (2004) végeztek összehasonlító vizsgálatokat. A *gapA* gén két szakaszára tervezett PCR-ek segítségével dolgoztak. A vizsgált gén GAPA 1F-GAPA 1R (1 PCR) általa felszaporított szakaszán a szekvenciaadatok alapján nagyobb, míg a Myc 3F-Myc 4R (2 PCR) primerpár által amplifikált szakaszon kisebb különbséget találtak az általuk vizsgált törzsek között (Kleven és mtsai. 2004). Jelen munka során Kleven és munkatársai (Kleven és mtsai. 2004) által tervezett ugyanezen két primer párt alkalmazva csupán egyik PCR-RFLP során (Myc 3F-Myc 4R primer párt használva) mutattunk ki különbséget a törzsek között. Amennyiben az általunk tervezett primereket alkalmaztuk, az MI 4229 törzs esetében több, az MG F vakcina törzs esetében pedig a *gapA* gén egy szakaszát nem mutattuk ki. Azaz ezek a génszakaszok ezekben a törzsekben jelentős változáson mentek keresztül. Az MG TS-11 vakcina törzs a *gapA* génen végzett RFLP alapján szintén egyértelműen megkülönböztethető a többi törzstől, amely különbség a szekvencia adatok alapján is megjelenik.

f.) *mgc2* génre specifikus PCR és RFLP analízis eredményének megbeszélése

Az *mgc2* génre specifikus, Kleven és munkatársai (2004) által tervezett primerpárt alkalmazva a szekvenciaadatok alapján a vizsgált törzsek között különbségeket jegyeztek meg (Kleven és mtsai. 2004). Ugyanezen primer párt alkalmazva a PCR-RFLP analízis során az MG X-95 törzs megkülönböztethető a többi vizsgált törzstől. Az *mgc2* génre specifikus, általunk tervezett PCR-RFLP segítségével a törzsek között több különbséget is kimutattunk. Ezen gén alapján az MI 4229, az MG F és az MG TS-11 vakcina törzsek, valamint az MG X-95 törzs egyértelműen megkülönböztethetők egymástól és a többi vizsgált törzstől. Ez utóbbiak ugyancsak több csoportba oszthatók. Ez alapján az *mgc2* gén igen variábilisnak mondható. Ezt megerősíti az elvégzett szekvencia analízis, hiszen a gén szekvenciájában az MG TS-11 és az MG X-95 törzsek esetében több inzerció, illetve egy deléción is megfigyelhető.

g.) *LP* génre specifikus PCR és RFLP analízis

Nascimento et al. által *LP* génnek nevezett szekvencia (Nascimento és mtsai, 1991) a vizsgált törzsek mindegyikében kimutatható volt. A törzsek között az RFLP-t követően sem találtunk különbséget. Nascimento és munkatársai (1991) az általuk tervezett PCR-t az *MG* detektálására tervezték és 17 *Mycoplasma*-fajra tesztelték. A tesztelt fajok közül csupán az *MG*-re kaptak specifikus reakciót, azonban az általuk vizsgált fajok között nem szerepelt az *MI*.

h.) *pvpA* génre specifikus PCR és RFLP analízis

A Liu és mtsai. által javasolt primerek (Liu és mtsai. 2001) és az általunk módosított PCR reakció, valamint RFLP alkalmazása során a törzsek között különbségek figyelhetők meg. Ezek a különbségek a szekvencia adatokban is megmutatkoznak. Eredményeink az *ScrFI* restriktív enzim alkalmazása során keletkezett termékek méretének megállapításán kívül összhangban állnak Liu és mtsai. (2001) által közölt eredményekkel.

8. Következtetések

A fentiek alapján az egyes törzsek jellemzésére az alábbi tesztek alkalmazhatóak:

8.1. Következtetések a genomon végzett RAPD PCR reakciók alapján

A Fan és mtsai. (1995) által tervezett, általunk módosított RAPD PCR reakció alapján a vizsgált törzseket 6 csoportba osztottuk be:

- A: MI 4229
- B: MG F
- C: MG TS-11
- D: MG MK-7 és MG S6
- E: MG MS-16
- F: MG X-95, MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm és MG M3

Ugyanakkor Charlton és mtsai. (1999b) által tervezett, általunk módosított RAPD PCR alapján szintén 6 csoportot különítettünk el, melyek azonban más összetételűek voltak:

- I: MI 4229
- II: MG F
- III: MG TS-11, MG MK-7 és MG S6
- IV: MG MS-16
- V: MG X-95
- VI: MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm és MG M3

Ezek alapján elmondható, hogy az MI 4229, az MG F és az MG MS-16 DNS mintázata mutatja a legnagyobb különbséget egymástól, illetve a többi törzstől, míg az MG FS-9, az MG RCl, az MG Rhigh, az MG Rlow, az MG Rhighm és az MG M3 törzsek DNS mintázata a leginkább hasonló egymáshoz.

8.2. Következtetések az egyes génszakaszokra specifikus PCR reakciók és az RFLP alapján

a.) recA génre specifikus PCR és az RFLP analízis eredménye

- Bencina által tervezett három pár primert (szóbeli közlés) és így három PCR rendszert használva az eredményeket következőképpen foglalhatjuk össze.
 - A PCR során kimutatható az összes vizsgált törzs az MI 4229-et is beleértve.
 - Az amplicon RFLP vizsgálata során a vizsgált törzsek között nem mutatkozott különbség.
- Az általunk használt PCR-t alkalmazva az MI 4229-et nem mutattuk ki. Az amplifikált termék tekintetében az MG törzseket két csoportba oszthatjuk:
A csoport: MG FS-9, MG X-95, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm és MG M3
B csoport: MG TS-11, MG MK-7, MG S6 és MG MS-16
- A szekvencia adatok alapján az MG TS-11 szekvenciája több pontmutációt tartalmaz, míg a többi szekvenált törzs (MG Rhigh és MG M3) esetében a szekvencia nem különbözik az MG Rlow törzsetől. Ez a néhány pontmutáció szerepet játszhat az MG TS-11 hőérzékenységében.

b.) crmA génre specifikus PCR és RFLP analízis eredménye

A *crmA* génen végzett vizsgálatok során a gén jellemzésére öt PCR-t fejlesztettünk ki. Mindegyik PCR ampliconját RFLP analízisnek vetettük alá. A vizsgálatok alapján az alábbi megállapításokat tehetjük:

- Az MI 4229 törzset csupán az 5. PCR (az AE016967 jelű szekvenciának 2602-3156 bp-ig terjedő szakaszán) során mutattuk ki
- Az MG F vakcina törzset csupán az 1. és az 5. PCR (az AE016967 jelű szekvenciának 40-719 bp-ig, valamint a 2602-3156 bp-ig terjedő szakaszán) során mutattuk ki
- Az MG MK-7, az MG S6 és az MG MS-16 törzseket a 2. PCR (az AE016967 jelű szekvenciának 683-1312 bp-ig terjedő szakaszán) során nem mutattuk ki

- Az RFLP mintázatok alapján a 3. és az 5. PCR során (az AE016967 jelű szekvenciának 1263-1864 bp-ig, valamint a 2602-3156 bp-ig terjedő szakasza) amplifikált fragmentek a legvariábilisabbak
- A 3. PCR amplikonjának *AluI* és *RsaI* enzimekkel történő emésztését követően a törzseket 4 csoportba soroltuk:
 - A csoport:** MG TS-11 és MG X-95
 - B csoport:** MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow és MG Rhighm
 - C csoport:** MG MK-7, MG S6 és MG MS-16
 - D csoport:** MG M3
- Az 5. PCR amplikonjának *MboI* enzimmel történő emésztését követően a törzseket 2 csoportba soroltuk:
 - A csoport:** MG X-95
 - B csoport:** többi vizsgált törzs (MI 4229-et is beleértve)
- Az 5. PCR amplikonjának *RsaI* enzimmel történő emésztését követően a törzseket 4 csoportba soroltuk:
 - I/1 csoport:** MI 4229, MG F, MG MK-7, MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm és MG M3
 - I/2 csoport:** MG TS-11
 - II csoport:** MG S6, MG MS-16
 - III csoport:** MG X-95
- A gén öt szakaszára specifikus PCR, valamint az MG TS-11, az MG Rhigh, az MG M3 és az MG X-95 törzsek esetében a 3. és az 5. PCR termékeinek (az AE016967 jelű szekvenciának 1263-1864 bp-ig, valamint a 2602-3156 bp-ig terjedő szakasza) szekvencia adatai alapján megállapítottuk, hogy az MG M3 törzs esetében a *crmA* gén egy 127 bp-ból álló addíciót tartalmaz. Emellett a vizsgált szekvenciák variabilitást mutattak (különösen az MG X-95 és az MG TS-11 törzsek esetében) az MG Rlow-éhoz képest.

c.) *crmB* génre specifikus PCR és RFLP eredménye

A *crmB* génen végzett vizsgálatok során a gén jellemzésére négy PCR-t fejlesztettünk ki. Mindegyik PCR amplikonját RFLP analízisnek vetettük alá. A vizsgálatok alapján az alábbi megállapításokat tehetjük:

- Az MI 4229 és az MG F törzseket egyik PCR-rel sem mutattuk ki
- A többi törzs vizsgálata során bármely PCR termék RFLP analízise során nem mutatkozott különbség

d.) *crmC* génre specifikus PCR és RFLP eredménye

A *crmC* génen végzett vizsgálatok során a gén jellemzésére öt PCR-t fejlesztettünk ki. Mindegyik PCR amplikonját RFLP analízisnek vetettük alá. A vizsgálatok alapján az alábbi megállapításokat tehetjük:

- Az RFLP alapján a *crmC* gén 1., 2. és 4. PCR által amplifikált fragmentjei variábilisak (63-709 bp-ig, 531-1030 bp-ig és 1892-2507 bp-ig terjedő szakaszok)
- Az 1. PCR termék *AluI* enzimmel történő emésztését követően a törzseket 2 csoportba osztottuk:
A csoport: MI 4229, MG F, MG MK-7, MG S6, MG MS-16, MG FS-9, MG X-95, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm és MG M3
B csoport: MG TS-11
- Az 1. PCR termék *HphI* enzimmel történő emésztését követően a törzseket szintén 2 csoportba osztottuk:
I csoport: MI 4229, MG F, MG TS-11 és MG X-95
II csoport: MG MK-7, MG S6, MG MS-16, MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm és MG M3
- A 2. PCR termék *AluI* enzimmel történő emésztését követően a törzseket 2 csoportba osztottuk:

A csoport: MG TS-11

B csoport: MI 4229, MG F, MG MK-7, MG S6, MG MS-16, MG FS-9, MG X-95, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm és MG M3

- A 4. PCR termék *FokI* enzimmel történő emésztését követően a törzseket 2 csoportba osztottuk:

A csoport: MG X-95

B csoport: MI 4229, MG F, MG TS-11, MG MK-7, MG S6, MG MS-16, MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm és MG M3

- A gén négy szakaszára specifikus PCR, valamint az MG TS-11, az MG Rhigh, az MG M3 törzsek esetében elvégzett 1., 2. és 4. PCR termék szekvencia analízise és az MG X-95 törzs esetében elvégzett 4. PCR termék szekvencia analízise alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált törzsek szekvenciái csak kisebb szakaszokon, illetve néhány pontmutációban különböznek az MG Rlow adatbankban közölt szekvenciájától.

e.) *gapA* génre specifikus PCR és RFLP analízis eredménye

- Kleven és munkatársai (2004) által tervezett két primer párt, és így az általunk módosított két PCR rendszert használva az eredményeket következőképpen foglalhatjuk össze.

- Az 1. PCR amplikonjának vizsgálata során a vizsgált törzsek között nem láttunk különbséget
- A 2. PCR amplikonjának *MboI* enzimmel történő emésztését követően a törzseket 2 csoportba osztottuk:

A csoport: MI 4229, MG F, MG TS-11, MG MK-7, MG S6, MG MS-16 és MG X-95

B csoport: MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm és MG M3

- A *gapA* génen végzett vizsgálatok során a gén jellemzésére hat PCR-t fejlesztettünk ki. Mindegyik PCR amplikonját RFLP analízisnek vetettük alá. A vizsgálatok alapján az alábbi megállapításokat tehetjük:

- Az MI 4229 törzset nem mutattuk ki a 2., a 3. és az 5. PCR során (az AE016967 jelű szekvenciának a 642-1359 bp-ig, a 1311-2000 bp-ig és a 2402-2929 bp-ig terjedő szakaszán)

- Az MG F törzs esetében a 4. PCR során (a gén 1878-2528 bp-ig terjedő szakaszán) nem kaptunk amplikont.
 - A 4. PCR termék *Mbo*I-el történő emésztése során a törzseket három csoportba osztottuk be:
 - A csoport:** MG TS-11
 - B csoport:** MG F, MG X-95, MG MK-7, MG S6, MG MS-16, MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm és MG M3
 - C csoport:** MI 4229
- A gén hat szakaszára specifikus PCR, valamint az MG TS-11, az MG Rhigh, az MG M3 törzsek esetében elvégzett 4. PCR termék szekvencia analízise alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált törzsek szekvenciáiban a pontmutációk mellett több kisebb variábilis régió is van.
- f.) *mgc2* génre specifikus PCR és RFLP analízis eredménye
- Kleven és munkatársai (Kleven és mtsai. 2004) által tervezett primer párt, és így az általunk módosított PCR rendszert használva az eredményeket következőképpen foglalhatjuk össze.
 - A PCR amplikonjának RFLP analízisét követően a vizsgált törzseket két csoportba soroltuk:
 - A csoport:** MG X-95
 - B csoport:** MI 4229, MG F, MG TS-11, MG MK-7, MG S6, MG MS-16, MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm és MG M3
 - Az *mgc2* génen végzett vizsgálatok során a gén jellemzésére PCR-t fejlesztettünk ki. A PCR amplikonját RFLP analízisnek vetettük alá. A vizsgálatok alapján az alábbi megállapításokat tehetjük:
 - Az amplikon *Hae*III-mal történő emésztése során a törzseket öt csoportba soroltuk be:
 - A csoport:** MG MK-7, MG MS-16 és MG S6
 - B csoport:** MG F
 - C csoport:** MG X-95
 - D csoport:** MG TS-11
 - E csoport:** MI 4229, MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm, MG M3

- Az amplitikon *PvuII*-vel történő emésztése során a törzseket négy csoportba soroltuk be:
 - I csoport:** MI 4229
 - II csoport:** MG X-95
 - III csoport:** MG TS-11
 - IV csoport:** MG F, MG MK-7, MG MS-16 és MG S6, MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm, MG M3

- Az amplitikon *VspI*-el történő emésztése során a törzseket három csoportba soroltuk be:
 - 1. csoport:** MI 4229, MG F, MG MK-7, MG MS-16 és MG S6
 - 2. csoport:** MG TS-11
 - 3. csoport:** MG X-95
 - 4. csoport:** MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm, MG M3

- A génre általunk tervezett specifikus PCR, valamint az MG TS-11, az MG Rhigh, az MG M3 és MG X-95 törzsek esetében elvégzett PCR termék szekvencia analízise alapján megállapítottuk, hogy az *mgc2* általunk vizsgált szekvenciájában a pontmutációkon kívül 3 nagy variábilis régiót különíthető el. Az MG TS-11 és az MG X-95 szekvenciájában a 316-320 és a 408-422 bp pozíciókban inzerció jelent meg. Emellett az MG X-95 szekvenciája a 497-560 bp pozícióig delécióit tartalmaz.

g.) *LP* génre specifikus PCR és RFLP analízis eredménye

Nascimento és mtsai. által *LP* génnek nevezett szekvenciára Nascimento és mtsai. (1991) által tervezett PCR és RFLP analízis alapján kapott eredményeinket az alábbiakban foglaljuk össze:

- Minden vizsgált törzset kimutattunk a PCR során
- A PCR-t és az RFLP-t követően a törzsek között nem találtunk különbséget

h.) *pvpA* génre specifikus PCR és RFLP analízis eredménye

A Liu és mtsai. (2001) által javasolt primerek és az általunk módosított PCR reakciót, valamint RFLP analízist követően az alábbi megállapításokat tehetjük:

- A PCR során a vizsgált törzsek mindegyike kimutatható, a PCR során eltérő méretű amplikonok keletkeznek.
- Az amplikon *AccI* enzimmel történő emésztése során a törzseket három csoportba soroltuk be:
 - A csoport:** MG F és MG X-95
 - B csoport:** MI 4229, MG TS-11, MG MK-7, MG MS-16 és MG S6
 - C csoport:** MG FS-9, MG RCl, MG Rlow, MG Rhigh, MG Rhighm és MG M3
- Az amplikon *PvuII* enzimmel történő emésztése során a törzseket négy csoportba soroltuk be:
 - I csoport:** MI 4229
 - II csoport:** MG F
 - III csoport:** MG X-95
 - IV csoport:** MG TS-11, MG MK-7, MG MS-16 és MG S6, MG FS-9, MG RCl, MG Rlow, MG Rhigh, MG Rhighm és MG M3
- Az amplikon *ScrFI* enzimmel történő emésztése során a törzseket három csoportba soroltuk be:
 - 1. csoport:** MG F
 - 2. csoport:** MG X-95
 - 3. csoport:** MI 4229, MG TS-11, MG MK-7, MG MS-16 és MG S6, MG FS-9, MG RCl, MG Rlow, MG Rhigh, MG Rhighm és MG M3
- A génre specifikus PCR, valamint az MG TS-11, az MG Rhigh, az MG M3 és MG X-95 törzsek esetében elvégzett PCR termék szekvencia analízise alapján megállapítottuk, hogy a *pvpA* általunk vizsgált régiójában a pontmutációkon és néhány kisebb variábilis régióon kívül az MG X-95 szekvenciája a 260-307 bp pozícióban, valamint a 319-330 bp pozícióban egy-egy deléciót tartalmaz.

A munka során a RAPD PCR, valamint az egyes génekre specifikus PCR-RFLP mintázatok alapján felállított *Mycoplasma* csoportokat a 8.1a. és a 8.1b. táblázatok tartalmazzák.

8.1a. táblázat. A munka során felállított *Mycoplasma*-csoportok. **Vastag betű:** jelen munka során kifejlesztett PCR-RFLP. ¹: törzsek, melyek az adott módszerrel nem mutathatóak ki.

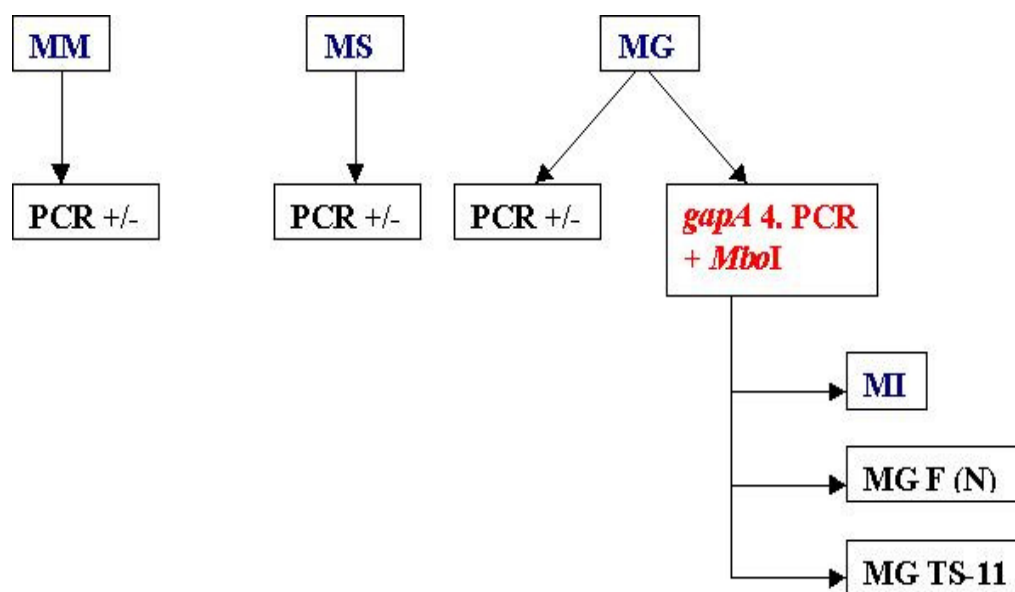
Gén/PCR	PCR száma	Restriktációs enzim	Csoportok	Nem kimutatható törzsek ¹
RAPD (Fan és mtsai. 1995)	-	-	A: MI 4229 B: MG F C: MG TS-11 D: MG MK-7, MG S6 E: MG MS-16 F: MG X-95, MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm, MG M3	-
RAPD (Charlton és mtsai. 1999)	-	-	I: MI 4229 II: MG F III: MG TS-11, MG MK-7, MG S6 IV: MG MS-16 V: MG X-95 VI: MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm, MG M3	-
<i>recA</i>	B3	<i>HphI, VspI</i>	-	-
	4	<i>HphI</i> <i>VspI</i>	A: MG FS-9, MG X-95, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm, MG M3 B: MG TS-11, MG MK-7, MG S6, MG MS-16	MI 4229
<i>crmA</i>	1	<i>MboI, VspI</i>	-	MI 4229
	2	<i>MboI, VspI</i>	-	MI 4229, MG F, MG MK-7, MG S6, MG MS-16
	3	<i>AluI, RsaI</i>	A: MG TS-11 és MG X-95 B: MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm C: MG MK-7, MG S6 és MG MS-16 D: MG M3	MI 4229, MG F
	4	<i>MboI, RsaI</i>	-	MI 4229, MG F
	5	<i>MboI</i> <i>RsaI</i>	A: MG X-95 B: többi vizsgált törzs I/1: MI 4229, MG F, MG MK-7, MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm, MG M3 I/2: MG TS-11 II: MG S6, MG MS-16 III: MG X-95	-
<i>crmB</i>	1	<i>HphI, VspI</i>	-	MI 4229, MG F
	2	<i>FokI, RsaI</i>		
	3	<i>HaeIII, RsaI</i>		
	4	<i>FokI, VspI</i>		
<i>crmC</i>	1	<i>AluI</i>	A: MG TS-11 B: többi vizsgált törzs	-
		<i>HphI</i>	I: MI 4229, MG F, MG TS-11 és MG X-95 II: MG MK-7, MG S6, MG MS-16, MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm, MG M3	
	2	<i>AluI</i>	A: MG TS-11 B: többi vizsgált törzs	
		<i>RsaI</i>	-	
	3	<i>HphI, VspI</i>	-	
	4	<i>FokI</i>	A: MG X-95 B: többi vizsgált törzs	
		<i>HphI</i>	-	
5	<i>HpaI, VspI</i>	-		

8.1b. táblázat. A munka során felállított *Mycoplasma*-csoportok. **Vastag betű:** jelen munka során kifejlesztett PCR-RFLP. ¹: törzsek, melyek az adott módszerrel nem mutathatók ki. Folytatás.

Gén/PCR	PCR száma	Restriktációs enzim	Csoportok	Nem kimutatható törzsek ¹
<i>gapA</i>	1	RsaI, VspI	-	-
	2	HpaI, MboI	-	MI 4229
	3	HphI, PvuII	-	MI 4229
	4	MboI	A: MG TS-11 B: MI 4229 C: MG F kivételével a többi vizsgált törzs	MG F
		VspI	-	
	5	HphI, RsaI	-	MI 4229
	6	PvuII, VspI	-	-
	K1	PvuII, VspI	-	-
K2	MboI	A: MI 4229, MG F, MG TS-11, MG MK-7, MG S6, MG MS-16, MG X-95 B: MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm, MG M3	-	
	VspI	-		
<i>mge2</i>	1	HaeIII	A: MG MK-7, MG MS-16, MG S6 B: MG F C: MG X-95 D: MG TS-11 E: MI 4229, MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm, MG M3	-
		PvuII	I: MI 4229 II: MG X-95 III: MG TS-11 IV: MG F, MG MK-7, MG MS-16 és MG S6, MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm, MG M3	
		VspI	1: MI 4229, MG F, MG MK-7, MG MS-16 és MG S6 2: MG TS-11 3: MG X-95 4: MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm, MG M3	
	K1	PvuII, VspI	A: MG X-95 B: többi vizsgált törzs	-
<i>LP</i>	1	FokI, HphI	-	-
<i>pvpA</i>	1	AccI	A: MG F és MG X-95 B: MI 4229, MG TS-11, MG MK-7, MG MS-16 és MG S6 C: MG FS-9, MG RCl, MG Rlow, MG Rhigh, MG Rhighm és MG M3	-
		PvuII	I: MI 4229 II: MG F III: MG X-95 IV: többi vizsgált törzs	
		ScrFI	1: MG F 2: MG X-95 3: többi vizsgált törzs	

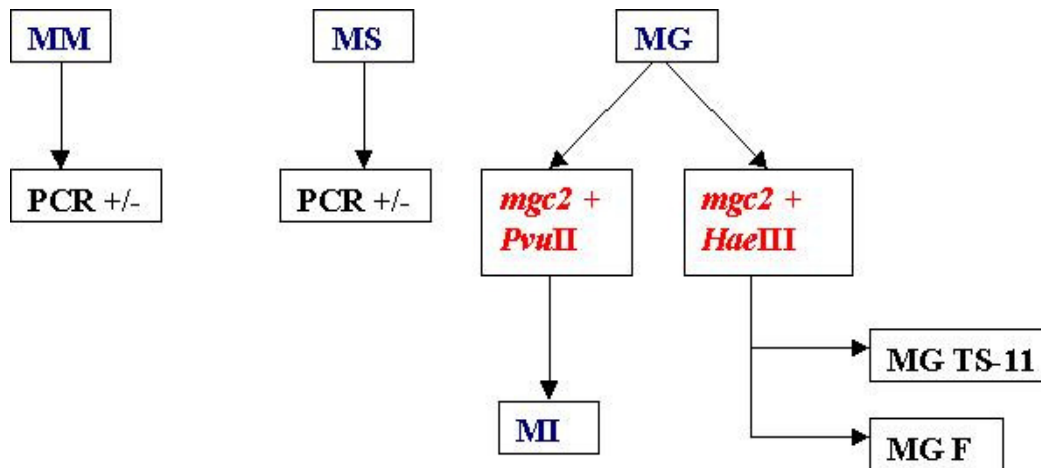
8.2.1. Az eredmények alapján tett módszertani javaslatok

Az eredményeink felhasználhatók a diagnosztikai gyakorlat során is (16. és 17. ábrák). A csirke- és pulyka állományokból az MG és az MI mellett a *M. meleagridis* (MM) és a *M. synoviae* (MS) szintén izolálható. Ez utóbbi két faj kimutatására irodalmi primerek állnak rendelkezésünkre (Boyle és mtsai. 1995; Lauerman és mtsai. 1993). A Mycoplasma tenyésztés és az elvégzett PCR eredményeiből e két faj jelenlétére, illetve hiányára következtethetünk. Az eredménytől függetlenül az MG és az MI jelenlétét szintén irodalmi primerekkel erősíthetjük meg a diagnosztikai eljárás során (Nascimento és mtsai. 1991; Marois és mtsai. 2002). Ha vizsgálatokat követően az MI és az MG fajokra pozitív eredményt kapunk, tovább folytathatjuk az eljárást. Amennyiben az MI és az MG, illetve az MG F és az MG TS-11 vakcina törzsek elkülönítése a célunk, a jelen munka során kifejlesztett, *gapA* génre specifikus 4. PCR amplikonjait *MboI* restrikciós enzimmal emésztve a törzsek között eltérő mintázatot kapunk (16. ábra).



16. ábra. Az eredmények alkalmazhatósága a diagnosztikai gyakorlatban I.

Az MI 4229, az MG F és az MG TS-11 törzsek elkülönítésére a *gapA* génre specifikus PCR mellett szintén a jelen munka során kifejlesztett, *mgc2* génre specifikus PCR-RFLP is alkalmazható. A PCR során keletkezett amplikont *PvuII* és *HaeIII* enzimekkel emésztve azonosíthatók a törzsek (17. ábra).



17. ábra. Az eredmények alkalmazhatósága a diagnosztikai gyakorlatban II.

A PCR-RFLP és szekvencia vizsgálatokat követően elmondható, hogy a patogenitásban, valamint a DNS repair-ben szereplő gének alapján az MG fajon belül a törzsek között több különbség figyelhető meg. A vizsgált gének közül a *crmB* és az *LP* gén egyáltalán nem bizonyult variábilisnak. A *crmC* és a *recA* gének kevésbé, míg a *crmA*, a *gapA*, az *mgc2* és a *pvpA* gének igen változékonyak, ezért azok a diagnosztikai eljárás során felhasználhatóak a MG törzsek elkülönítésére. Ugyanakkor a gének egyes szakaszai változékonyabbaknak mutatkoztak, mint ugyanazon a génen belüli egyéb szekvenciák. A *crmA* gén közbenső, illetve 3' vég felé eső szekvenciája a törzsek között változékonyságot mutat. Ugyanez mondható el a *crmC* gén 5', illetve a *gapA* gén 3' régiójáról is. Egyes génszakaszok ugyanakkor némely törzseknél az általunk tervezett PCR reakciókkal egyáltalán nem mutathatók ki. A *crmA* gén bizonyos szakaszai az MI 4229, az MG F, az MG MK-7, az MG S6 és az MG MS-16 törzsek esetében nem szaporíthatók fel, de az első két törzset figyelembe véve a *gapA* génről is hasonló az eredmény. Emellett a *crmB* gén egészét az MI 4229-nél és az MG F vakcina törzsnél nem mutattuk ki.

8.3. Következtetések a statisztikai eredmények alapján

A RAPD PCR, valamint az egyes génekre specifikus PCR-RFLP mintázatok alapján készített többváltozós statisztikai eredményeket követően a törzsek négy csoportba sorolhatók:

- **A csoport:** MG FS-9, MG RCl, MG Rhigh, MG Rlow, MG Rhighm és az MG M3 törzsek közötti PCR- és RFLP-mintázatbeli különbségek minimálisak
- **B csoport:** MG MK-7, MG S6 és MG MS-16
- **C csoport:** MG X-95 és MG TS-11
- **D csoport:** MG F és MI 4229

9. Új eredmények és használhatóságuk

A különböző génekre általunk tervezett, vagy irodalmi leírások általunk végzett módosításai alapján kialakított PCR-RFLP reakciók termékeinek eltérő mérete alkalmas a különböző csirke-, pulyka- és vadmadár állományokból izolált virulens és kevésbé virulens törzsek egymással, valamint a vakcina törzsekkel való összehasonlítására.

A kutatásaink eredményeképpen

1. A *gapA*, az *mgc2* és a *pvpA* gének alapján az MI 4229 és a vizsgált MG törzsek között egyértelmű különbségeket találtunk.
2. Az MG TS-11 vakcina törzset a *crmC* és a *gapA* gének alapján egyértelműen megkülönböztettük a többi MG és MI 4229 törzstől.
3. A *gapA* gén alapján az MG F vakcina törzs és a többi vizsgált Mycoplasma-törzs között egyértelmű különbségeket találtunk.
4. Ezek az adatok a fertőzöttség járványtani nyomozásában is használhatóak.
5. Az MG Rhigh és az MG M3 törzsek esetében részben meghatároztuk a *recA*, a *crmA*, a *crmC*, a *gapA*, a *pvpA* és az *mgc2* gének nukleotid-sorrendjét.
6. Az MG TS-11 vakcina törzs esetében részben meghatároztuk a *recA*, a *crmA*, a *crmC*, a *gapA* és az *mgc2* gének nukleotid-sorrendjét.
7. Az MG X-95 törzs esetében meghatároztuk a *crmA*, a *crmC*, az *mgc2* és a *pvpA* gén részleges szekvenciáit.

10. Irodalomjegyzék

Abdul-Wahab, O. M., Ross, G. and Bradbury, J. M. (1996). Pathogenicity and cytoadherence of *Mycoplasma imitans* in chicken and duck embryo tracheal organ cultures. *Infect. Immun.* **64**, 563-568.

Athamna, A., Kramer, M. R. and Kahane, I. (1996). Adherence of *Mycoplasma pneumoniae* to human alveolar macrophages. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **15**, 135-141.

Athamna, A., Rosengarten, R., Levisohn, S., Kahane, I. and Yogev, D. (1997). Adherence of *Mycoplasma gallisepticum* involves variable surface membrane proteins. *Infect. Immun.* **65**, 2468-2471.

Avakian, A. P., Kleven, S. H. and Glisson, J. R. (1988). Evaluation of the specificity and sensitivity of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits, the serum plate agglutination test and the hemagglutination-inhibition test for antibodies formed in response to *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* **32**, 262-272.

Avakian, A. P. and Kleven, S. H. (1990a). The humoral immune response of chickens to *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* studied by immunoblotting. *Vet. Microbiol.* **24**, 155-169.

Avakian, A. P. and Kleven, S. H. (1990b). Evaluation of sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis purified proteins of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* as antigens in a dot-enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.* **34**, 575-584.

Baseggio, N., Glew, M. D., Markham, P. F., Whithear, K.G. and Browning G. F. (1996). Size and genomic location of the pMGA multigene family of *Mycoplasma gallisepticum*. *Microbiology*, **142**, 1429-1435.

Baseman, J. B., Lange, M., Criscimagna, N. L., Giron, J. A. and Thomas, C. A. (1995). Interplay between mycoplasmas and host target cells. *Microb. Pathog.* **19**, 105-116.

Belák, S., Rockborn, G., Wierup, M., Belák, K., Berg, M. and Linné, T. (1987). Aujeszky's disease in pigs diagnosed by a simple method of nucleic acid hybridization. *J. Vet. Med.* **34**, 519-529.

Belák, S., Linné, T., Magyar, G., Harrach, B., Benkő, M., Klingeborn, B. and Bartha, A. (1988). Bovine herpesvirus 1: rapid diagnosis of infection by direct filter hybridization. *Mol. Cell. Probes*, **2**, 147-156.

Ben Abdelmoumen, B. and Roy R. S. (1995). Antigenic relatedness between seven avian mycoplasma species as revealed by Western blot analysis. *Avian Dis.* **39**, 250-262.

Bencina, D., Kleven, S. H., Elfaki, M. G., Snoj, A., Dove, P., Dorrer, D. and Russ, I. (1994). Variable expression of epitopes on the surface of *Mycoplasma gallisepticum* demonstrated with monoclonal antibodies. *Avian Pathol.* **23**, 19-36

Bencina, D. (2002). Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Pathol.* **31**, 535-547.

Bíró, J., Povazsán, J., Körösi, L., Glávits, R., Hufnagel, L. and Stipkovits, L. (2005). Safety and efficacy of *Mycoplasma gallisepticum* TS-11 vaccine for the protection of layer pullets against challenge with virulent *M. gallisepticum* strain. *Avian Pathol.* **34**, 341-347.

Boguslavsky, S., Menaker, D., Lysnyansky, I. T., Liu, Levisohn, S., Rosengarten, C., Garcia, M. and Yogev, D. (2000). Molecular characterization of the *Mycoplasma gallisepticum* *pvpA* gene which encodes a putative variable cytoadhesin protein. *Infect. Immun.* **68**, 3956-3964.

Boyle, J. S., Good, R.T. and Morrow, C. J. (1995). Detection of the turkey pathogens *Mycoplasma meleagridis* and *M. iowae* by amplification of genes coding for rRNA. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 1335-1338.

Bradbury, J. M. (1977). Rapid biochemical tests for characterisation of the *Mycoplasmatales*. *J. Clin. Microbiol.* **5**, 531-534.

- Bradbury, J. M., Abdul-Wahab, O. M., Yayari, C. A., Dupiellet, J. P. and Bove, J. M. (1993). *Mycoplasma imitans* sp. nov. is related to *Mycoplasma gallisepticum* and found in birds. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 721-728.
- Bradbury, J. M. (1998). Identification of mycoplasmas by immunofluorescence. *Methods Mol. Biol.* **104**, 119-125.
- Buntz, B., Bradbury, J. M., Vuillaume, A. and Rousselot-Paillet, D. (1986). Isolation of *Mycoplasma gallisepticum* from geese. *Avian Pathol.* **15**, 615-617.
- Carli, K. T. and Eyigor, A. (2003). Real-time polymerase chain reaction for *Mycoplasma gallisepticum* in chicken trachea. *Avian Dis.* **47**, 712-717.
- Carpenter, T. E., Mallison, E. T., Miller, K. F., Gentry, R. F. and Schwarz, L. D. (1981). Vaccination with F strain *Mycoplasma gallisepticum* to reduce production losses in layer chickens. *Avian Dis.* **25**, 404-409.
- Chambaud, I., Heilig, R., Ferris, S., Barbe, V., Samson, D., Galisson, F., Moszer, I., Dybvig, K., Wroblewski, H., Viari, A., Rocha, E. P. C. and Blanchard, A. (2001). The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2145-2153.
- Charlton, B. R., Bickford, A. A., Chin, R. P. and Walker, R. L. (1999a). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from turkeys from the central valley of California. *J. Vet. Diagn. Invest.* **11**, 408-415.
- Charlton, B. R., Bickford, A. A., Walker, R. L. and Yamamoto, R. (1999b). Complementary randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis patterns and primer sets to differentiate *Mycoplasma gallisepticum* strains. *J. Vet. Diagn. Invest.* **11**, 158-161.
- Chausee, M. S., Cole, R. L. and van Putten, J. P. M. (2000). Streptococcal erythrogenic toxin B abrogates fibronectin dependent internalization of *Streptococcus pyogenes* by cultured mammalian cells. *Infect. Immun.* **68**, 3226-3232.

Chhabra, P. C. and Goel, M. C. (1981). Biological response of chickens to *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* **25**, 279-293.

Collett, S. R., Thomson, D. K., York, D. and Bisschop, S. P. (2005). Floor pen study to evaluate the serological response of broiler breeders after vaccination with ts-11 strain *Mycoplasma gallisepticum* vaccine. *Avian Dis.* **49**, 133-137.

Cookson, K. C. and Shivaprasad, H. L. (1994). *Mycoplasma gallisepticum* infection in chukar partridges, pheasants and peafowl (case report). *Avian Dis.* **38**, 911-921.

Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* **16**, 10881-10890.

Czifra, Gy., Sundquist, B., Tuboly, T. and Stipkovits, L. (1993a). Evaluation of a monoclonal blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Mycoplasma gallisepticum*-specific antibodies. *Avian Dis.* **37**, 680-688.

Czifra, Gy., Tuboly, T., Sundquist, B. G., and Stipkovits, L (1993b). Monoclonal antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* membrane proteins. *Avian Dis.* **37**, 689-696.

Czifra, Gy., Kleven, S. H., Engström, B. and Stipkovits L. (1995). Detection of specific antibodies directed against a consistently expressed surface antigen of *Mycoplasma gallisepticum* using a monoclonal blocking enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.* **39**, 28-31.

Dandekar, T., Huynen, M., Regula, J. T., Ueberle, B., Zimmermann, C. U., Andrade, M. A., Doerks, T., Sanchez-Pulido, L., Snel, B., Suyama, M., Yuan, Y. P., Herrmann, R. and Bork, P. (2000). Re-annotating the *Mycoplasma pneumoniae* genome sequence: adding value, function and reading frames. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3278-3288.

Duensing, T. D., Wing, J. S. and van Putten, J. P. M. (1999). Sulfated polysaccharide-directed recruitment of mammalian host proteins: a novel strategy in microbial pathogenesis. *Infect. Immun.* **67**, 4463-4468.

Dybvig, K. and Woodard, A. (1992) Construction of *recA* mutants of *Acholeplasma laidlawii* by insertional inactivation with a homologous DNA fragment. *Plasmid*, **28**, 262-266.

Elfaki, M. G., Kleven, S. H., Jin, L. H. and Ragland, W. L. (1993a). Protection against airsacculitis with sequential systemic and local immunization of chickens using killed *Mycoplasma gallisepticum* bacteria with iota carrageenan adjuvant. *Vaccine*, **11**, 311-317.

Elfaki, M. G., Kleven, S. H., Ragland, W. L., Steffens, W. L. and Bankenship, L. L. (1993b). Evidence for a common epitope on the surface of *Mycoplasma gallisepticum* defined by monoclonal antibody. *Vet. Microbiol.* **35**, 161-177.

Elgavish, S. and Shaanan, B. (1997). Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 462-467.

Ellakany, H., Fabian, K., Stipkovits, L. (1997). Immunoblot examination of humoral response of chickens infected with *Mycoplasma gallisepticum* at various ages. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **20**, 319-333.

Erno, H. and Stipkovits, L. (1973a). Bovine mycoplasmas. Culture and biochemical studies I. *Acta Vet. Scand.* **14**, 436-449.

Erno, H. and Stipkovits, L. (1973b). Bovine mycoplasmas. Culture and biochemical studies II. *Acta Vet. Scand.* **14**, 450-463.

Evans, R. D. and Hafez, Y.S. (1992). Evaluation of a *Mycoplasma gallisepticum* strain exhibiting reduced virulence for prevention and control of poultry mycoplasmosis. *Avian Dis.* **36**, 197-201.

Ewing, M. L., Kleven, S. H. and Brown, M. B. (1996). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and hemagglutination-inhibition for detection of antibody to *Mycoplasma gallisepticum* in commercial broiler, fair and exhibition, and experimentally infected birds. *Avian Dis.* **40**, 13-22.

Fan, H. H., Kleven, S. H. and Jackwood, M. W. (1995). Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* **39**, 729-735.

Fraser, C. M., Gocayne, J. D., White, O., Adams, M. D., Clayton, R. A., Fleischmann, R. D., Bult, C. J., Kerlavage, A. R., Sutton, G., Kelley, J. M., Fritchman, R. D., Weidman, J. F., Small, K. V., Sandusky, M., Fuhrman, j., Nguyen, D., Utterback, T. R., Saudek, D. M., Philips, C. A., Merrick, J. M., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Bott, K. F., Hu, P. C., Lucier, T. S., Peterson, S. N., Smith, H. O., Hutchinson, C. A. 3rd and Venter, J. C. (1995). The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, **270**, 397-403.

Frey, J. (2002). *Mycoplasmas of Animals*. In: Razin, S. and Herrmann, R. (eds), *Mycoplasmas of Animals in Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York pp. 45-71.

García, M., Elfaki, M. G. and Kleven, S. H. (1994). Analysis of the variability in expression of *Mycoplasma gallisepticum* surface antigens. *Vet. Microbiol.* **42**, 147-158.

García, M., Jackwood, M. W., Levisohn, S. and Kleven, S. H. (1995). Detection of *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, and *M. iowae* by multi-species polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Avian Dis.* **39**, 606-616.

García, M., Jackwood, M. W., Head, M., Levisohn, S. and Kleven, S. H. (1996). Use of species-specific oligonucleotide probes to detect *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* and *M. iowae* PCR amplification products. *J. Vet. Diagn. Invest.* **8**, 56-63.

García, M., Ikuta, N., Levisohn, S. and Kleven, S. H. (2005). Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Avian Dis.* **49**, 125-132.

Geary, S. J., Forsyth, M. H., Saoud, S. A., Wang, G., Berg, D. E. and Berg, C. M. (1994). *Mycoplasma gallisepticum* strain differentiation by arbitrary primer PCR (RAPD) fingerprinting. *Mol. Cell. Probes.* **8**, 311-316.

Gibbs, P., Kleven, S. H. and Jackwood, M. W. (1994). Analysis and characterization of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from Pennsylvania. *Avian Dis.* **38**, 475-482.

Giron, J. A., Lange, M. and Baseman, J. B. (1996). Adherence, fibronectin binding and induction of cytoskeleton reorganization in cultured human cells by *M. penetrans*. *Infect Immun.* **64**, 197-208.

Glass, J. I., Lefkowitz, E. J., Glass, J. S., Heiner, C. R., Chen, E. Y. and Cassell, G. H. (2000). The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature*, **407**, 757-762.

Glass, J. I., Lartigue, C., Pfannkoch, C., Baden-Tillson, H., Smith, H. O., Venter, J. C., Roske, K., Wise, K. S., Calcutt, M. J., Nelson, W. C. and Nierman, W. C. (2005). Submitted National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA

Glew, M. D., Markham, P. F., Browning, G. F. and Walker, I. D. (1995). Expression studies on four members of the pMGA multigene family in *Mycoplasma gallisepticum* S6. *Microbiology*, **141**, 3005-3014.

Glew, M. D., Baseggio, N., Markham, P. F., Browning, G. F. and Walker, I. D. (1998). Expression of the pMGA genes of *Mycoplasma gallisepticum* is controlled by variation in the GAA trinucleotide repeat lengths within the 5' noncoding regions. *Infect. Immun.* **66**, 5833-5841.

Glew, M. D., Browning, G. F., Markham, P. F. and Walker, I. D. (2000). pMGA phenotypic variation in *Mycoplasma gallisepticum* occurs *in vivo* and is mediated by trinucleotide repeat length variation. *Infect Immun.* **68**, 6027-6033

Goh, M. S., Gorton, T. S., Forsyth, M. H., Troy, K. E. and Geary, S. J. (1998). Molecular and biochemical analysis of a 105 kDa *Mycoplasma gallisepticum* cytoadhesin (GapA). *Microbiology*, **144**, 2971-2978.

Gorton, T. S. and Geary, S. J. (1997). Antibody-mediated selection of a *Mycoplasma gallisepticum* phenotype expressing variable proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **155**, 31-38.

Hannan, P. C. T. (2000). Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. International Research Programme on Comparative Mycoplasmology. *Vet. Res.* **31**, 373-395.

Harasawa, R., Pitcher, D. G., Ramirez, A. S. And Bradbury, J. M. (2004). A putative transposase gene in the 16S-23S rRNA intergenic spacer region of *Mycoplasma imitans*. *Microbiology*, **150**, 1023-1029.

Hnatow, L. L., Keeler, C. L., Jr Tessmer, L. L., Czymmek, K. and Dohms, J. E. (1998). Characterization of *mgc2*, a *Mycoplasma gallisepticum* cytoadhesin with homology to the *Mycoplasma pneumoniae* 30-kilodalton protein P30 and *Mycoplasma genitalium* P32. *Infect. Immun.* **66**, 3436-3442.

Hwang, Y. S., Panangala, V. S., Rossi, C. R., Giambrone, J. J. And Lauerma, L. H. (1989). Monoclonal antibodies that recognize specific antigens of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae*. *Avian Dis.* **33**, 42-52.

Jaffe, J. D., Stange-Thomann, N., Smith, C., DeCaprio, D., Fisher, S., Butler, J., Calvo, S., Elkins, T., Fitzgerald, M. G., Hafez, N., Kodira, C. D., Major, J., Wang, S., Wilkinson, J., Nicol, R., Nusbaum, C., Birren, B., Berg, H. C. and Church, G. M. (2004). The complete genome and proteome of *Mycoplasma mobile*. *Genome Res.* **14**, 1447-1461.

Jensen, J. S., Blom, J. and Lind, K. (1993). Intracellular location of *Mycoplasma genitalium* in cultured Vero cells as demonstrated by electron microscopy. *Int. J. Path.* **75**, 91-98.

Johansson, K.-E. and Petterson, B. (2002). Taxonomy of *Mollicutes*. In: Razin, S. and Herrmann R. (eds): Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. pp. 1-29.

Jordan, F. T. W. (1979). Avian *Mycoplasmas*. In: Tully, J. G. and Whitcomb, R. F. (eds) *The Mycoplasmas*. Academic Press. New York.

Jordan, F. T. W., Erno, H., Cottew, G. S., Hinz, K. H. and Stipkovits, L. (1982). Characterization and taxonomic description of five *Mycoplasma* serovars (serotypes) of avian

origin and their elevation to species rank and further evaluation of the taxonomic status of *Mycoplasma synoviae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**, 108-115.

Kaszanyitzky, É., Czifra, Gy. and Stipkovits, L. (1994). Detection of *Mycoplasma gallisepticum* antibodies in turkey blood samples by ELISA and by the slide agglutination and hemagglutination tests. *Acta Vet. Hung.* **42**, 67-78.

Kempf, I. (1997). DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. *Acta Vet. Hung.* **45**, 373-386.

Kempf, I., Gesbert, F., Guittet, M., Bennejean, G. and Stipkovits, L. (1994). Evaluation of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* antibodies. *Avian Pathol.* **23**, 329-338.

Kempf, I. and Gesbert, F. (1998). Comparison of serological tests for detection of *Mycoplasma gallisepticum* antibodies in eggs and chicks hatched from experimentally infected hens. *Vet. Microbiol.* **60**, 207-213.

Kiss, I., Matiz, K., Kaszanyitzky, É., Chávez, Y. and Johansson, K.-E. (1997). Detection and identification of avian mycoplasmas by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay. *Vet. Microbiol.* **58**, 23-30.

Kleven, S. H. (1975). Antibody response to avian *Mycoplasma*. *Am. J. Vet. Res.* **36**, 563-565.

Kleven, S. H. (1981). Transmissibility of the F strain of *Mycoplasma gallisepticum* in Leghorn chickens. *Avian Dis.* **25**, 1005-1018.

Kleven, S. H., Browning, G. F., Bulch, D. M., Ghioca, E., Morrow, C. J. and Whithear, K. G. (1988). Examination of *Mycoplasma gallisepticum* strains using restriction endonucleases DNA analysis and DNA-DNA hybridization. *Avian Pathol.* **17**, 559-580.

Kleven, S. H. (1998a). Pen trial studies on the use of live vaccines to displace virulent *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. *Avian Dis.* **42**, 300-306.

Kleven, S. H. (1998b). Mycoplasmas in the etiology of multifactorial respiratory disease. *Poultry Science*, **77**, 1146-1149.

Kleven, S. H., Khan, M. I. and Yamamoto, R. (1990). Fingerprint of *Mycoplasma gallisepticum* strains isolated from multiple-age layers vaccinated with live F strain. *Avian Dis.* **34**, 984-990.

Kleven, S. H., Fulton, R. M., García, M., Ikuta, V. N., Leiting, V. A., Liu, T., Ley, D. H., Opengart, K. N., Rowland, G. N. and Wallner-Pendleton, E. (2004). Molecular characterization of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from turkeys. *Avian Dis.* **48**, 562-569.

Krause, D. C., Leith, D. K., Wilson, R. M. and Baseman, J. B. (1982). Identification of *Mycoplasma pneumoniae* proteins associated with hemadsorption and virulence. *Infect. Immun.* **35**, 809-817.

Krause, D. C. and Balish, M. F. (2001). Structure, function, and assembly of the terminal organelle of *Mycoplasma pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **198**, 1-7.

Lauerman, L. H., Hoerr, F. J., Sharpton, A. R., Shah, S. M. and van Santen, V. L. (1993). Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.* **37**, 829-834.

Layh-Schmitt, G. and Harkenthal, M. (1999). The 40- and 90-kDa membrane proteins (ORF6 gene product) of *Mycoplasma pneumoniae* are responsible for the tip structure formation and P1 (adhesin) association with the Triton shell. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**, 143-149.

Levisohn, S. and Kleven, S. H. (2000). Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). *Revue Scientifique et Technique*, **19**, 425-442.

Levisohn, S., Dykstra, M. J., Lin, M. Y. and Kleven, S. H. (1986). Comparison of in vivo and in vitro methods for a pathogenicity evaluation for *Mycoplasma gallisepticum* in respiratory infection. *Avian Pathol.* **15**, 233-246.

- Levisohn, S., Rosengarten, R. and Yogev, D. (1995). *In vivo* variation of *Mycoplasma gallisepticum* antigen expression in experimentally infected chickens. *Vet Microbiol.* **45**, 219–231.
- Ley, D. H., Avakian, A. P. and Berkhoff, J. E. (1993). Clinical *Mycoplasma gallisepticum* infection in multiplier breeder and meat turkey caused by F strain: infection by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, restriction endonuclease analysis and polymerase chain reaction. *Avian Dis.* **37**, 854-862.
- Ley, D. H., McLaren, J. M., Miles, A. M., Barnes, H. J. and Franz, G. (1997a). Transmissibility of live *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains ts-11 and 6/85 from vaccinated layer pullets to sentinel poultry, and identification by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Avian Dis.* **41**, 187-194.
- Ley, D. H., Berkhoff, J. E. and Levisohn, S. (1997b). Molecular epidemiological investigations of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) conjunctivitis in songbirds by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses. *Emerg. Infect. Dis.* **3**, 375-380.
- Ley, D. H. and Yoder, H. W. Jr. (1997). *Mycoplasma gallisepticum* infection. In Calnek, B. W., Barnes, H. J., Beard, C. W., Reid, W. M. & Yoder, H. W. Jr. (Ed.), *Diseases of Poultry* 9th edn (pp. 194-207). Ames: Iowa State University Press.
- Lin, M. Y. and Kleven, S. H. (1982). Pathogenicity of 2 strains of *Mycoplasma gallisepticum* in turkeys. *Avian Dis.* **26**, 360-364.
- Liu, L., Payne, D. M., vanSanten, V. L., Dybvig, K. and Panangala, V. S. (1998). A protein (M9) associated with monoclonal antibody-mediated agglutination of *Mycoplasma gallisepticum* is a member of the pMGA family. *Infect. Immun.* **66**, 5570-5575.
- Liu, T., García, M., Levisohn, S., Yogev, D. and Kleven, S. H. (2001). Molecular variability of the adhesin-encoding gene *pvpA* among *Mycoplasma gallisepticum* strains and its application in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1882-1888.

- Lo, S. C., Hayes, M. M., Kotani, H., Pierce, P. F., Wear, D. J., Newton, P. B. 3rd, Tully, J. G. and Shih, J. W. (1993). Adhesion onto and invasion into mammalian cells by mycoplasma penetrans: a newly isolated mycoplasma from patients with AIDS. *Mod. Pathol.* **6**, 276-280.
- Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J. and Wyns, L. (1998). Legume lectin structure. *Biochem. Biophys. Acta* **1383**, 9-36.
- Luttrell, M. P., Fischer, J. R., Stalknecht, D. E. and Kleven, S. H. (1996). Field investigation of *Mycoplasma gallisepticum* in house finches (*Carpodacus mexicanus*) from Maryland and Georgia. *Avian Dis.* **40**, 335-345.
- Lysnyansky, I., Garcia, M. and Levisohn, S. (2005) Use of mgc2-polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for rapid differentiation between field isolates and vaccine strains of *Mycoplasma gallisepticum* in Israel. *Avian Dis.* **49**, 451.
- Marais, A. J., Bove, M. and Renaudin, J. (1996). Characterization of the *recA* gene regions of *Spiroplasma citri* and *Spiroplasma melliferum*. *J. Bacteriol.* **178**, 7003-7009.
- Markham, P. F., Glew, M. D., Brandon, M. R., Walker, J. D. and Whithear, K. G. (1992). Characterization of a major hemagglutinin protein from *Mycoplasma gallisepticum*. *Infect. Immun.* **60**, 3885-3891.
- Markham, P. F., Glew, M. D., Whithear, K. G. and Walker, I. D. (1993). Molecular cloning of a member of the gene family that encodes pMGA, a hemagglutinin of *Mycoplasma gallisepticum*. *Infect. Immun.* **61**, 903-909.
- Markham, P. F., Glew, M. D., Browning, G. F., Whithear, K. G. and Walker, I. D. (1998) Expression of two members of the pMGA gene family of *Mycoplasma gallisepticum* oscillates and is influenced by pMGA-specific antibodies. *Infect. Immun.* **66**, 2845-2853.
- Markham, P. F., Duffy, M. F., Glew, M. D. and Browning, G. F. (1999). A gene family in *Mycoplasma imitans* closely related to the pMGA family of *Mycoplasma gallisepticum*. *Microbiology*, **145**, 2095-2103.

Marois, C., Dufour-Gesbert, F. and Kempf, I. (2001). Molecular differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma imitans* strains by pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* **48**, 695-703.

Marois, C., Dufour-Gesbert, F. and Kempf, I. (2002). Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in environmental samples. *Avian Pathol.* **31**, 163-168.

May, J. D. and Branton, S. L. (1997). Identification of mycoplasma isolates by ELISA. *Avian Dis.* **41**, 93-96.

McMartin, D. A., DaMassa, A. J., McKeem, W. D., Read, D., Daft, B. and Lam, K. M. (1996). Experimental reproduction of *Mycoplasma gallisepticum* disease in chukar partridges (*Alectoris gracea*). *Avian Dis.* **40**, 408-416.

Mekkes, D. R. and Feberwee, A. (2005). Real-time polymerase chain reaction for the qualitative and quantitative detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Pathol.* **34**, 348-354.

Mohammed, H. O., Carpenter, T. E. and Yamamoto, R. (1987). Economic impact of MG and MS in commercial layer flocks. *Avian Dis.* **31**, 477-489.

Morowitz, H. J. (1984). The completeness of molecular biology. *Isr. J. Med. Sci.* **20**, 750-753.

Nascimento, E. R., Yamamoto, R., Herrick, K. R. and Tait, R. C. (1991). Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* **35**, 62-69.

Nascimento, E. R., Yamamoto, R. and Khan, M. I. (1993). *Mycoplasma gallisepticum* F-vaccine strain-specific polymerase chain reaction. *Avian Dis.* **37**, 203-211.

Noormohammadi, A. H., Markham, P. F., Kanci, A., Whithear, K. G. and Browning, G. F. (2000). A novel mechanism for control of antigenic variation in the hemagglutinin gene family of *Mycoplasma synoviae*. *Mol. Microbiol.* **35**, 911-923.

- Nunoya, T., Yagihashi, T., Tajima, M. and Nagasawa, Y. (1995). Occurrence of keratokonjunctivitis apparently caused by *Mycoplasma gallisepticum* in layer chickens. *Avian Pathol.* **32**, 11-18.
- Panangala, V. S., Morsy, M. A., Gresham, M. M. and Toivivo-Kinnucan, M. (1992). Antigen variation of *Mycoplasma gallisepticum*, as detected by use of monoclonal antibodies. *Am. J. Vet. Res.* **53**, 1139-1144.
- Papazisi, L., Troy, K. E., Gorton, T. S., Liao, X. and Geary, S. J. (2000). Analysis of cytoadherence-deficient, GapA-negative *Mycoplasma gallisepticum* strain R. *Infect. Immun.* **68**, 6643-6649.
- Papazisi, L. (2002a). A modified live *Mycoplasma gallisepticum* vaccine to protect chickens from respiratory disease. *Vaccine*, **20**, 3709-3719.
- Papazisi, L. (2002b). GapA and CrmA coexpression is essential for *Mycoplasma gallisepticum* cytoadherence and virulence. *Infect Immun.* **70**, 6839-6845.
- Papazisi, L., Gorton, T. S., Kutish, G., Markham, P. F., Browning, G. F., Nguyen, D. K., Swartzell, S., Madan, A., Mahairas, G. and Geary, S. J. (2003). The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain Rlow. *Microbiology*, **149**, 2307-2316.
- Pillai, S. R., Mays, H. L. Jr., Ley, D. H., Luttrell, P., Panangala, V. S., Farmer, K. L. and Roberts, S. R. (2003). Molecular variability of house finch *Mycoplasma gallisepticum* isolates as revealed by sequencing and restriction fragment length polymorphism analysis of the *pvpA* gene. *Avian Dis.* **47**, 640-648.
- Podani, J. (1997). Bevezetés a többváltozós biológiai adatfeltárás rejtelmeibe. Scientia Kiadó, Budapest.
- Pruthi, A. K. and Kharole, M. U. (1981). Sequential pathology of genital tract in chickens experimentally infected with *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* **25**, 768-778.

- Razin, S. (1983). Characteristics of the mycoplasmas as a group. In: Razin S, Tully J G. , editors. *Methods in mycoplasmaology*. Academic Press, New York, N.Y, pp. 3–7.
- Razin, S., Yogev, D. and Naot, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1094-1156.
- Reinhardt, A. K., Gautier-Bouchardon, A.V., Gicquel-Bruneau, M., Kobisch, M. and Kempf, I. (2005). Persistence of *Mycoplasma gallisepticum* in chickens after treatment with enrofloxacin without development of resistance. *Vet Microbiol.* **106**, 129-37.
- Roberts, D. H. and Olesuk, O. M. (1967). Serological studies with *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.* **11**, 104-119.
- Rodriguez, R. and Kleven, S. H. (1980). Evaluation of a vaccine against *Mycoplasma gallisepticum* in commercial broilers. *Avian Dis.* **24**, 879-889.
- Rosengarten, R. and Wise, K. S. (1990). Phenotypic switching in Mycoplasmas. Phase variation of diverse surface lipoproteins. *Science*, **247**, 315-318.
- Ross, T., Slavik, M., Bayyari, G. and Skeeles, J. (1990). Elimination of *Mycoplasma* plate agglutination cross reactions in sera from chickens inoculated with infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* **34**, 663-667.
- Sántha, M., Burg, K., Raskó, I. and Stipkovits, L. (1987). A species-specific DNA probe for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Infect. Immun.* **55**, 2857-2859.
- Sasaki, Y., Ishikawa, J., Yamashita, A., Oshima, K., Kenri, T., Furuya, K., Yoshino, C., Horino, A., Shiba, T., Sasaki, T. and Hattori, M. (2002). The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. *Nucleic Acids Res.* **30**, 5293-5300.
- Seto, S., Layh-Schmitt G., Kenri, T. and Miyata, M. (2001). Visualization of the attachment organelle and cytoadherence proteins of *Mycoplasma pneumoniae* by immunofluorescence microscopy. *J. Bacteriol.* **183**, 1621-1630.

- Shaw, J. H. and Falkow, S. (1988). Model for invasion of human tissue culture cells by *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* **56**, 1625-1632.
- Soeripto, K. G., Whithear, K. G., Cottew, G. S. and Harrigan, K. E. (1989a). Immunogenicity of *Mycoplasma gallisepticum*. *Austr. Vet. J.* **66**, 73-77.
- Soeripto, K. G., Whithear, K. G., Cottew, G. S. and Harrigan, K. E. (1989b). Virulence and transmissibility of *Mycoplasma gallisepticum*. *Austr. Vet. J.* **66**, 65-72.
- Stadtlander, C. T., Watson, H. L., Simecka, J. W. and Cassell, G. H. (1993). Cytopathogenicity of *Mycoplasma fermentans* (including strain incognitus). *Clin. Infect. Dis.* **1**, 289-301.
- Stipkovits, L., Belák, S., McGwire, B. S., Ballagi-Pordány, A. and Sántha, M. (1988). Rapid identification of *Mycoplasma gallisepticum* using a simple method of nucleic acid hybridization. *Mol. Cell. Probes*, **2**, 339-344.
- Stipkovits, L., Czifra, Gy. and Sundquist, B. (1993). Indirect ELISA for detection of specific antibody. *Avian Path.* **22**, 491-494.
- Sundquist, B. G., Czifra, G. and Stipkovits, L. (1996). Protective immunity induced in chicken by a single immunization with *Mycoplasma gallisepticum* immunostimulating complexes (ISCOMS). *Vaccine*, **14**, 892-897.
- Talkington, F. D. and Kleven, S. H. (1985). Evaluation of protection against colonization of the chicken trachea following administration of *Mycoplasma gallisepticum* bacterin. *Avian Dis.* **29**, 998-1003.
- Talkington, F. D., Kleven, S. H. and Brown, J. (1985). An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* in experimentally infected chickens. *Avian Dis.* **29**, 53-70.
- Thomas, C. B. and Sharp, P. (1998). Detection of antigenic variation among strains of *Mycoplasma gallisepticum* by enzyme-linked immunosorbent inhibition assay (ELISA) and Western blot analysis. *Avian Dis.* **32**, 748-756.

Thornton, G. A. (1973). Non specific agglutination of *Mycoplasma gallisepticum* by rheumatoid factor-like antiglobulin in chickens infected with *Streptococcus faecalis* or *Staphylococcus aureus*. *J. Comp. Pathol.* **83**, 41-47.

Troy, K. E. (1998). M.S. thesis. The University of Connecticut, Storrs, Conn.

Turner, K. S. and Kleven, S. H. (1998). Eradication of live F strain *Mycoplasma gallisepticum* vaccine using live ts-11 on a multiage commercial layer farm. *Avian Dis.* **42**, 404-407.

Vasconcelos, A. T., Ferreira, H. B., Bizarro, C. V., Bonatto, S. L., Carvalho, M. O., Pinto, P. M., Almeida, D. F., Almeida, L. G., Almeida, R., Alves-Filho, L., Assuncao, E.N., Azevedo, V. A., Bogó, M. R., Brigido, M. M., Brocchi, M., Burity, H. A., Camargo, A. A., Camargo, S. S., Carepo, M. S., Carraro, D. M., de Mattos Cascardo, J. C., Castro, L. A., Cavalcanti, G., Chemale, G., Collevatti, R. G., Cunha, C. W., Dallagiovanna, B., Dambros, B. P., Dellagostin, O. A., Falcao, C., Fantinatti-Garboggini, F., Felipe, M. S., Fiorentin, L., Franco, G. R., Freitas, N. S., Frias D., Grangeiro, T. B., Grisard, E. C., Guimaraes, C. T., Hungria, M., Jardim, S. N., Krieger, M. A., Laurino, J. P., Lima, L. F., Lopes, M. I., Loreto, E. L., Madeira, H. M., Manfio, G. P., Maranhao, A. Q., Martinkovics, C. T., Medeiros, S. R., Moreira, M. A., Neiva, M., Ramalho-Neto, C. E., Nicolas, M. F., Oliveira, S. C., Paixao, R. F., Pedrosa, F. O., Pena, S. D., Pereira, M., Pereira-Ferrari, L., Piffer, I., Pinto, L. S., Potrich, D. P., Salim, A. C., Santos, F. R., Schmitt, R., Schneider, M. P., Schrank, A., Schrank, I. S., Schuck, A. F., Seuanez, H. N., Silva, D. W., Silva, R., Silva, S. C., Soares, C. M., Souza, K. R., Souza, R. C., Staats, C. C., Steffens, M. B., Teixeira, S. M., Urmenyi, T. P., Vainstein, M. H., Zuccherato, L. W., Simpson, A. J. and Zaha, A. (2005). Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *J. Bacteriol.* **187**, 5568-5577.

Wang, H., Fadl, A. A. and Khan, M. I. (1997). Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasmas. *Mol. Cell. Probes.* **11**, 211-216.

Westberg, J., Persson, A., Holmberg, A., Goesmann, A., Lundeberg, J., Johansson, K. E., Pettersson, B. and Uhlen, M. (2004). The genome sequence of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Genome Res.* **14**, 221-227.

Whithear, K. G., Soeripto, Harringan, K. E. and Ghiocas, E. (1990a). Safety of temperature sensitive mutant *Mycoplasma gallisepticum* vaccine. *Aust. Vet. J.* **67**, 159-165.

Whithear, G. H. (1990b). Immunogenicity of a temperature sensitive mutant *Mycoplasma gallisepticum* vaccine. *Aust. Vet. J.* **67**, 168-74.

Whithear, G. H. (1996). Control of avian mycoplasmoses by vaccination. *Rev. Sci. Tech.* **15**, 1527-1553.

Winner, F., Rosengarten, R. and Citti, C. (2000). In vitro cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. *Infect. Immun.* **68**, 4238–4244.

Winner, F., Markova, I., Much, P., Lugmair, A., Siebert-Gulle, K., Vogl, G., Rosengarten, R. and Citti, C. (2003). Phenotypic switching in *Mycoplasma gallisepticum* hemadsorption is governed by a high-frequency, reversible point mutation. *Infect. Immun.* **71**, 1265-1273.

Yoder, H. W., Jr. (1986). A historical account of the diagnosis and characterization of strains of *Mycoplasma gallisepticum* of low virulence. *Avian Dis.* **30**, 510-518.

Yoder, H. W. Jr. (1989). Nonspecific reactions to *Mycoplasma* serum plate antigens induced by inactivated poultry disease vaccines. *Avian Dis.* **33**, 60-68.

Yoder, H. W., Jr. (1991). *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: Diseases of poultry. 9th ed. B. W. Calnek, C. W. Beard, H. J. Barnes, W. M. Reid and H. W. Yoder, Jr., (eds.). Iowa State University Press. Ames. Iowa, pp. 198-212.

Yogev, D., Levisohn, S., Kleven, S. H., Halachimi, D. and Razin, S. (1988). Ribosomal RNA gene probes to detect intraspecies heterogeneity in *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae*. *Avian Dis.* **32**, 220-231.

Yogev, D., Levisohn, S. and Razin, S. (1989). Genetic and antigenic relatedness between *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. *Vet. Microbiol.* **19**, 75-84.

Yogev, D., Menaker, D., Strutzberg, K., Levisohn, S., Kirchhoff, H., Hinz, K. H. and Rosengarten, R. (1994). A surface epitope undergoing high-frequency phase variation is shared by *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma bovis*. *Infect. Immun.* **62**, 4962-4968.

Zou, N. and Dybvig, K. (2002). DNA replication, Repair and Stress Response. In: Razin, S. and Herrmann R. (eds): *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. pp 303-321.

11. Publikációs lista

Folyóirat cikkek

Bíró, J., Noémi, E., Szathmáry, Zs. és Stipkovits, L. (2004). *Mycoplasma bovis* kimutatása különböző PCR-rendszerek segítségével. *Magy. Áo. Lapja*, **126**, 626-630.

Lazarev, V. N., Stipkovits, L., Bíró, J., Miklody, D., Shkarupeta, M. M., Titova, G. A., Akopian, T. A. and Govorun, V. M. (2004). Induced expression of the antimicrobial peptide melittin inhibits experimental infection by *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. *Microbes Inf.* **6**, 536-541.

Stipkovits, L., Kadra, B., Süveges, T., Bíró, J. és Schmidt, J. (2005). *Mycoplasma hyopneumoniae* kísérleti vakcinák összehasonlító értékelése. *Magy. Áo. Lapja*, **127**, 13-20.

Bíró, J., Povaszán, J., Kőrösi, L., Glávits, R., Hufnagel, L. and Stipkovits, L. (2005). Safety and efficacy of *Mycoplasma gallisepticum* TS-11 vaccine for the protection of layer pullets against challenge with virulent *M. gallisepticum* strain. *Avian Path.* **34**, 341-347.

Szathmáry, S., Rajapakse, N., Székely, I., Pitlik, E., Bíró, J., Erdei, N. and Stipkovits, L. (2005). Binding of mycoplasmas to solid phase adsorbents. *Acta Vet. Hung.* **53**, 299-307.

Előadás és poszter absztraktok

Bíró, J., Stipkovits, L. and Miklódy, D. (2003). Testing and application of three primer pairs for detection of *Mycoplasma bovis* by PCR. In: *Abstracts of the 14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology*. Balatonfüred, Hungary, 2003.

Stipkovits, L., Bitay, Z., Simon, A., Bíró, J. and Beregszászi, A. (2003). Studies on infertility of goose eggs associated with *Mycoplasma* infection. *Convention Notes from the 140th AVMA Annual Convention*. Denver, Colorado, 2003.

Stipkovits, L., Bíró, J., Povaszán, J., Kőrösi, L., Mészáros, J. and Glávits, R. (2003). Study of safety and efficacy of *Mycoplasma gallisepticum* TS-11 vaccine. *Convention Notes from the 140th AVMA Annual Convention*, Denver, Colorado, 2003.

Stipkovits, L., Bíró, J., Szathmary, S. and Klein, U. (2004). Sensitivity testing of Mycoplasma pathogens to antimicrobials. *International Pig Veterinary Society 18 th Congress*, Hamburg, Germany, 2004.

Stipkovits, L., Bíró, J., Erdei, N. és Szathmáry, Zs. (2004). *Mycoplasma bovis* kimutatására alkalmas primerek optimalizálása és alkalmazása. *A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése és a X. Fermentációs Kollokvium*. Keszthely, 2004.

Stipkovits, L., Bíró, J., Erdei, N., Szathmáry, Zs. és Klein, U. (2004). Mycoplasmák antibiotikum érzékenységének vizsgálata. *A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése és a X. Fermentációs Kollokvium*. Keszthely, 2004.

Szathmáry, Zs., Bíró, J., Dobos-Kovács, M., Erdei, N. és Stipkovits, L. (2004). Az infertilitás vizsgálata libákban a Mycoplasma fertőzöttség tükrében. *A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése és a X. Fermentációs Kollokvium*. Keszthely, 2004.

Bíró J., Erdei N., Szathmáry Zs. és Stipkovits L.: A Mycoplasma gallisepticum és a gazdasejt kapcsolata. *Akadémiai beszámolók*, 2005.

Szathmáry Zs., Erdei N., Bíró J. és Stipkovits L.: A Mycoplasma és a gazdaszervezet kölcsönhatásának befolyásolása. *Akadémiai beszámolók*, 2005.

Erdei N., Bíró J., Szathmáry Zs. és Stipkovits L.: Mycoplasma bovis-szal fertőzött, majd vakcinázott borjak immunoblot analízise. *Akadémiai beszámolók*, 2005.

Tenk M., Bálint Á., Dencső L., Bíró J. és Stipkovits L.: Mycoplasma bovis specifikus PCR rendszer kialakítása. *Akadémiai beszámolók*, 2005.

12. Köszönetnyilvánítás

E helyen szeretném megköszönni mindazok segítségét, akik közreműködtek a disszertáció létrejöttében.

Elsőként köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Stipkovits Lászlónak a szakmai tanácsaiért, értékes észrevételeiért és kritikáiért.

Köszönettel tartozom Dr. Harrach Balázsnak, az MTA Állatorvos-tudományi Kutató Intézete Igazgatójának, hogy lehetővé tette számomra a disszertáció elkészítését.

Szintén szeretnék köszönetet mondani kollégáimnak, Erdei Noéminek és Székely Ibolyának, akik tanácsaik mellett a laboratóriumi munka során is nagy segítségemre voltak, valamint megköszönöm azt a türelmet, melyet a disszertáció elkészítése alatt tanúsítottak.

Köszönetet szeretnék mondani Bernáth Balázsnak a munka során felmerülő számítástechnikai problémák megoldásáért.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani dr. Szathmáry Zsuzsannának a munka egésze alatt nyújtott támogatásáért.

Végül, de nem utolsósorban köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak a disszertáció elkészítése során nyújtott nagy türelmükért.