



SZENT ISTVÁN EGYETEM
ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA



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

Doktori értekezés tézisei

Bíró Judit

MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete
2006

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető:

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

Témabizottsági tagok:

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

Bevezetés

A baromfiágazatban fellépő gazdasági veszteség egyik okozója a *Mycoplasma gallisepticum* (MG) fertőzöttség. A fertőzöttség terjedésének okai a járványtani védekezés hiányossága, valamint újabb variáns törzsek elterjedése. Emellett az élő vakcinák alkalmazásával történő védekezési eljárás is növekszik.

A MG és több más *Mycoplasma* faj mellett a baromfiállományokból *M. imitans* (MI) is izolálható, mely fenotipikus tulajdonságaiban hasonló a MG-hoz, azonban molekuláris tulajdonságai alapján különböznek egymástól. Ugyanakkor a két faj között szerológiai keresztreakciókat tapasztalhatunk, ami diagnosztikai nehézséget okozhat. A *Mycoplasma* fertőzöttség diagnosztikájában a szerológia és az izolálás mellett a fejlődő molekuláris biológiai módszerek is segítséget nyújtanak.

A kutatások egyik iránya a MG törzsek DNS mintázaton alapuló megkülönböztetését jelenti. A patogenitásban részt vevő fehérjéket kódoló génszakaszok PCR-rel való vizsgálata során nyert mintázatok alkalmasak a különböző csirke- és pulykaállományokból izolált virulens és kevésbé virulens törzsek elkülönítésére (egymással, valamint vakcina törzsekkel való összehasonlítására), illetve a járványtani nyomozás során.

Mindezek figyelembevételével munkám célja:

1. MI és MG törzsek RAPD PCR-rel való összehasonlítása.
2. MI és MG törzsek egyes génszakaszainak PCR-RFLP módszerrel történő összehasonlítása.
3. A PCR-ek során keletkezett egyes amplikonok szekvenálása, valamint a szekvenciák összehasonlítása.
4. Az MI és MG törzsek összehasonlítása többváltozós statisztikai módszerek segítségével.

Anyag és módszer

A felhasznált Mycoplasma törzsek

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

- Az MG F és MG TS-11 élő vakcinaként használt törzsek.
- Az MG MK-7 (patogén) és MG MS-16 (nem patogén) Japán csirke izolátumok.
- Az MG FS-9 (1226) magyarországi csirke légzsákoból származó izolátum.
- Az MG X-95 és az MG S6 izolátumok.
- Az MG Rlow magas patogenitású törzs és ennek nem patogén származékai (MG Rhigh, MG Rhighm, MG RCl, MG M3).

Az MG törzsek mellett az MI 4229 törzset is bevontam a vizsgálatokba.

A Mycoplasma-törzsek összehasonlításának alapja

A Mycoplasma-törzsek tenyésztését követően a DNS-t tisztítottuk, majd két irodalmi RAPD PCR-t (Fan és mtsai. 1995; Charlton és mtsai. 1999), valamint a *recA*, a *crmA*, *crmB*, *crmC*, *gapA*, *mgc2*, *LP* és *pvpA* génekre specifikus PCR-RFLP módszereket használtuk a törzsek jellemzésére. A *recA* gén a károsodott DNS javításáért felelős, a *pvpA* gén hemagglutinint, míg a többi vizsgált gén adhezint kódol melyek a MG patogenitásában játszanak szerepet. Ezekre a génekre irodalmi primerek felhasználásán kívül több PCR-t terveztünk úgy, hogy a gén egészét lefedjék, majd a keletkezett termékeket restriktációs enzimekkel emésztettük. A primerek tervezéséhez a MG Rlow patogén törzs ismert genomja szolgált alapul. A keletkezett PCR-RFLP mintázatok alapján többváltozós statisztikai eljárásokat végeztünk. Emellett a keletkezett

amplikonok egy részét (bizonyos törzsek és gének esetében) szekvenáltattuk, majd a szekvenciákat összehasonlítottuk.

Eredmények

1. A RAPD PCR eredményei

A két irodalmi RAPD PCR-t alkalmazva a mintázatok alapján a *Mycoplasma*-törzseket egyaránt 6-6-csoportba osztottuk be, ezek a csoportok azonban nem fedték egymást. Fan és mtsai. (1995) által tervezett RAPD PCR segítségével a MI 4229, a MG F és a MG TS-11 vakcina törzsek egyértelműen elkülöníthetőek egymástól és a többi vizsgált törzstől. Ugyanakkor Charlton és mtsai. (1999) primereivel ez nem volt lehetséges.

2. Az egyes génekre specifikus PCR-RFLP eredményei

a.) *recA* génre specifikus PCR-RFLP eredményei

Az irodalmi primerek segítségével a vizsgált törzsek között nem tudtunk különbséget tenni, ugyanakkor a MI 4229 is kimutatható volt. Amennyiben az általunk tervezett PCR-RFLP módszereket alkalmaztuk, a MI 4229-et nem mutattuk ki és a törzseket két csoportba osztottuk

b.) *crmA* génre specifikus PCR-RFLP eredményei

A *crmA* gén jellemzésére általunk tervezett öt PCR reakciót használtunk. A vizsgálat során a génen két variábilis régiót különítettünk el, melyek PCR-RFLP mintázatai alapján a törzsek több csoportba voltak besorolhatóak. Emellett a MI 4229 és az MG F vakcina törzs esetében a gén több, az MG MK-7, az MG S6 és az MG MS-16 törzsek esetében pedig egy szakasza nem mutatható ki.

c.) *crmB* génre specifikus PCR-RFLP eredményei

A gén jellemzésére tervezett négy PCR reakció, valamint az RFLP mintázatok alapján a törzsek között nem mutatkoztak különbségek. A MI 4229 és a MG F vakcina törzsek esetében nem mutattuk ki a *crmB* gén egy szakaszát sem.

d.) *crmC* génre specifikus PCR-RFLP eredményei

A *crmC* gén vizsgálatára öt PCR-t fejlesztettünk ki. A restrikciós emésztést követően a gén három szakasza mutatkozott variábilisnak, a PCR-RFLP segítségével pedig a MG TS-11 vakcina törzs a többi törzstől elkülöníthető.

e.) *gapA* génre specifikus PCR-RFLP eredményei

A gén jellemzésére irodalmi PCR-eken kívül saját tervezésű PCR-RFLP módszereket is használtunk. A génen belül találtunk olyan szakaszt, amely segítségével a MI 4229, valamint a MG F és a MG TS-11 vakcina törzsek is elkülöníthetőek egymástól és a többi vizsgált törzstől. Ennek alapján ez a módszer diagnosztikai eljárások során is alkalmazható.

f.) *mgc2* génre specifikus PCR-RFLP eredményei

Az *mgc2* gén variabilitása révén az erre a génre specifikus, általunk tervezett PCR-RFLP módszer szintén alkalmasnak bizonyult a vizsgált törzsek elkülönítésére és a diagnosztikai vizsgálatokra.

g.) *LP* génre specifikus PCR-RFLP eredményei

A gén jellemzésére használt irodalmi PCR reakció, valamint az RFLP mintázatok alapján a törzsek között nem mutatkoztak különbségek.

h.) pvpA génre specifikus PCR-RFLP eredményei

Irodalmi primereket felhasználva a gén PCR-RFLP mintázatai alapján a törzseket több csoportba osztottuk. Ezek azonban nem voltak alkalmasak arra, hogy a MG TS-11 vakcina törzset egyértelműen elkülönítsük.

3. A szekvencia analízis eredményei

Szekvencia analízist a *recA*, a *crmA*, a *crmC*, a *gapA*, az *mgc2* és a *pvpA* gének esetében a MG TS-11, a MG Rhigh, a MG X-95 és a MG M3 törzseknél végeztünk. A vizsgálat alapján a *crmA*, a *gapA* és a *mgc2* gének bizonyultak a legváltozékonyabbaknak.

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 különbséget 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 különbséget találtunk.
4. **Ezek az adatok a fertőzőtség 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.

Saját közlések jegyzéke

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., Povazsán, 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.

Bíró, J., Erdei, N., Székely I. and Stipkovits, L. (2006). Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* R, and *M. gallisepticum* F strains using molecular methods. *Acta Vet. Hung.* (submitted)

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). *Mycoplasma*mák 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 beszámoló, 2005.*

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

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

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

Köszönetnyilvánítás

Elsőként köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Stipkovits Lászlónak a szakmai tanácsaiért, értékes észrevételeiért és kritikáiért. Köszönettel tartozom Dr. Harrach Balázsnak, az MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete 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.