

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**A POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ FELHASZNÁLÁSA A
MAGYARORSZÁGI ÁLLATORVOSI DIAGNOSZTIKÁBAN**

Kiss István

Állatorvostudományi Egyetem, Budapest

1998

Kiss István az Állatorvostudományi Egyetem (1078 Budapest, István u. 2.) Ph.D. hallgatója 1994 óta. Munkahelye a Debreceni Állategészségügyi Intézet, (4031 Debrecen, Bornemissza u. 3-7., igazgató: Dr. Tanyi János, az állatorvos-tudomány kandidátusa). Kiss István a munka elvégzéséhez szükséges molekuláris biológiai ismereteket részben a Magyar Tudományos Akadémia Állatorvostudományi Kutatóintézetében (1143 Budapest, Hungária krt. 21.), a Dr. Benkő Mária és Dr. Harrach Balázs (az állatorvos-tudomány kandidátusai) vezette laboratóriumban, részben pedig a Liegei Egyetem (Boulevard de Colonster 20., 4000 Liege, Belgium) Állatorvosi Fakultásának az Etienne Thiry professzor által vezetett Virologia-Immunológia Tanszékén szerezte.

Témavezető: Dr. Harrach Balázs

az állatorvos-tudomány kandidátusa

Konzulensek: Dr. Solti László

az állatorvos-tudomány kandidátusa

Dr. Tanyi János

az állatorvos-tudomány kandidátusa

TARTALOM

	Oldal
1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK	5
IRODALMI ÁTTEKINTÉS. 2. A PCR ALAPJAI	8
2.1. A PCR LÉPÉSEI ÉS ÖSSZETEVŐI	9
2.1.1. Minta-előkészítés	9
2.1.2. A primerek kiválasztása	11
2.1.3. A DNS-PCR puffere	14
2.1.4. A PCR során használt enzimek	15
2.1.5. A ciklusok paraméterei	17
2.2. A "PLATEAU" JELENSÉG	19
2.3. A SPECIFICITÁST BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK	21
2.4. A PCR TERMÉKEK KIMUTATÁSA	21
2.5. A PCR SORÁN ALKALMAZOTT KONTROLLOK	24
2.6. KONTAMINÁCIÓ	25
3. RNS KIMUTATÓ PCR (RT-PCR)	27
3.1. AZ RNS MINŐSÉGE	27
3.2. A REVERZ TRANSZKRIPTÁZOK	28
3.3. PRIMER VÁLASZTÁS A CDNS SZINTÉZISÉHEZ	29
4. A KÓROKOZÓK KIMUTATÁSÁT SZOLGÁLÓ PCR SAJÁTOSÁGAI	31
4.1. ÉRZÉKENYSÉG ÉS SPECIFICITÁS	31
4.2. A KÓROKOZÓK HETEROGENITÁSA	32
4.3. A DIAGNOSZTIKAI PCR TERVEZÉSE	33

5. KÍSÉRLETEK	36
5.1. Homológ DNS szekvenciák kimutatása állati adenovírusokból polimeráz láncreakció felhasználásával	36
5.2. A kutyák fertőző májgyulladás: a kutya 1-es típusú adenovírusának kimutatása a polimeráz láncreakcióval	46
5.3. Baromfira patogén mycoplasmák kimutatása és azonosítása polimeráz láncreakcióval és restrikciós fragment hossz polimorfizmus vizsgálattal	53
5.4. A Derzsy-féle betegség diagnosztikája a polimeráz láncreakció felhasználásával	62
5.5. Pestivírusok kimutatása PCR-rel	67
6. ÖSSZEFOGLALÁS	79
7. IRODALOM	84
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	104

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

A polimeráz láncreakciót (PCR) széles körben alkalmazzák felfedezése óta mind kutatási célokra, mind pedig a diagnosztika eszközeként. A PCR viszonylagos egyszerűségének valamint rendkívüli érzékenységének és specifikusságának köszönheti népszerűségét, így nem meglepő, hogy a technika alkalmazási köre rohamosan növekszik, s napjainkban is egyre újabb távlatokat kínál. Leggyakoribb felhasználási területei közé tartozik a genomiális DNS vagy cDNS direkt klónozása (Temesgen és Eschrich, 1996), a DNS *in vitro* mutagenezise, manipulálása (Higuchi, 1989), igazságügyi minták genetikai ujjlenyomatozása (von Beroldingen et al., 1989), korai stádiumú embriók ivar-meghatározása (Macháty et al., 1993) és öröklődő betegségek diagnosztikája (Gelehrter et al., 1990), allél-variánsok analízise (Timme és Thompson, 1994), az RNS szerkezetének vizsgálata (Ansari-Lari et al., 1996), genom ujjlenyomatozás (Luo et al., 1994), a genomiális és a cDNS nukleotid-sorrendjének direkt meghatározása (Reeben és Prydz, 1994), és **fertőző ágensek jelenlétének vizsgálata** (Eeles et al., 1992; Berencsi és Minárovits, 1997), mely területet valósággal forradalmasított a polimeráz láncreakció.

A PCR alapvető mechanizmusa, vagyis az, hogy egy adott nukleinsav szakaszt milliós nagyságrendben megsokszoroz, több aspektusból is kedvező feltételeket teremt a vizsgáló számára: egyrészt, elméletileg elegendő ha a keresett nukleinsav darab csak egy kópiában van jelen a reakcióelegyben, a technika képes ezt szabad szemmel látható mennyiségűre sokszorozni; másrészt, a nagy mennyiségben szintetizált nukleinsav darabok további vizsgálatokat tesznek lehetővé (restrikciós enzimekkel történő vágás, nukleotid-sorrend meghatározás), amihez előzetesen nem kellett a genetikai anyag "tulajdonosát" elszaporítani.

Jelentősen hozzájárult a PCR diagnosztikai alkalmazhatóságához az is, hogy kiindulási anyagként mind DNS mind pedig RNS használható hozzá (természetesen az utóbbi reverz

transzkriptáz enzimmel szintetizált cDNS-en keresztül). A PCR egyébként is nagyfokú érzékenysége tovább tökéletesíthető a későbbiekben részletezendő ún. jel-felerősítő eszközökkel. A fent említett tulajdonságai alapján nyilvánvaló, hogy a PCR bizonyos mértékig átveheti a kórokozó hagyományos, gyakran hosszú időt igénybevevő izolálását. Mindazonáltal a diagnózis minden kétséget kizáró felállításához vagy megerősítéséhez, valamint további járványtani vizsgálatok elvégzéséhez még mindig szükséges és feltehetően a jövőben is szükséges lesz az adott kórokozó kitenyésztése ill. izolálása, amennyiben ez lehetséges. Vannak kórokozók ugyanis, melyeket igen nehéz tenyészteni, akár amiatt, hogy *in vitro* nem vagy csak erősen korlátozott mértékben szaporodnak, akár amiatt, hogy pl. az adott vírus elszaporításához szükséges gazdasejteket nehéz laboratóriumi körülmények között fenntartani. Ezeket a nehézségeket valamelyest áthidalja a poliklonális ill. monoklonális ellenanyagok felhasználása a fertőző betegségek diagnosztikájában, melyek szintén képesek lehetnek akár a kórokozó elszaporítása nélkül is kimutatni annak jelenlétét, ha a kórokozó felületén nagyobb számban jelenlévő epitópokhoz kötődnek. Az ellenanyagok felhasználását ugyanakkor korlátozzák a gazdasejtek hapténjeivel vagy egyéb, de kórtani szempontból kisebb jelentőségű vagy akár közömbös mikroorganizmusokkal szemben gyakran megfigyelt keresztreakciók, ill. az alkalmazott ellenanyagok esetleges gyenge haptén-kötő képessége. A latens fertőzést okozó vírusok esetében problémát jelent az is, hogy aktív vírus-szaporodás hiányában a vírus fehérjéinek kimutatására irányuló kísérletek lehetnek hiábavalóak (Welch et al., 1992; Ballagi-Pordány et al., 1992).

Egy diagnosztikai eljárás során mindig lényeges a mintavétel invazív ill. nem-invazív jellege, valamint a minta mennyisége. A PCR ebből a szempontból is kitűnik azzal a sajátosságával, hogy akár tűhegynyi bioptátum ill. néhány mikroliter szövetfelülúszó vagy egyéb folyékony anyag elegendő a vizsgálat elvégzéséhez. Végül, de nem utolsó sorban a PCR

bizonyos esetekben alkalmas lehet olyan vizsgálatok elvégzésére is, amelyekben a kiindulási anyag minősége (pl. annak rothadtsága miatt) más diagnosztikai eljárások elvégzését nem teszi lehetővé.

A PCR fent említett tulajdonságai egyértelművé teszik létjogosultságát az állatorvosi diagnosztikában is, ahogy erről már Belák és Ballagi-Pordány (1992; 1993) összefoglalójában beszámolt. Jelen munkám célja is hasonló volt: a Debreceni Állategészségügyi Intézet diagnosztikai PCR laboratóriumának megszervezése és beüzemelése. Az ehhez szükséges előtanulmányokat és modell kísérleteket Budapesten, a Magyar Tudományos Akadémia Állatorvostudományi Kutatóintézetében témavezetőm, Dr. Harrach Balázs, ill. Belgiumban, a Liegei Egyetem Állatorvosi Fakultásának Virologia-Immunológia Tanszékén, Etienne Thiry professzor irányítása alatt végeztem. Az intézetünkben bevezetett módszerek között van olyan, amelyet az irodalomból vettünk át és kismértékben módosítottunk saját céljainknak megfelelően, van olyan, amelyet különböző eljárások általunk leghatékonyabbnak ítélt fejezeteiből állítottunk össze, s olyan is, amelyet eredetileg más alkalmazásra írtak le, de kísérleteink alapján bebizonyosodott, hogy az általunk kijelölt (addig még nem vizsgált) diagnosztikai célokra is megfelel.

Mivel ezen az alkalmazási területen munkám az elsők között készült Magyarországon, remélhetőleg nyújthat bizonyos útmutatást a további, hasonló célú felhasználók számára is. Éppen ezért magát a "standard" technológiát is igyekeztem viszonylag részletesen áttekinteni a következő fejezetben, különös tekintettel a potenciális hibaforrásokra, valamint ezek kiküszöbölésére, majd az RNS kimutató PCR-t tekintem át, s végül az intézetünkben alkalmazott módszerek ismertetésére kerül sor.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2. A PCR ALAPJAI

A polimeráz láncreakció (PCR) *in vitro* módszer meghatározott DNS-szakaszok enzimatisz felfzaporítására, két, a megsokszorozandó szakaszt közrefogó specifikus oligonukleotid primer segítségével (Saiki 1989). A reakcióelegy a következők keverékéből áll: a nukleinsavat (DNS) tartalmazó minta, az oligonukleotid primerek, a 4 dezoxinukleotid-trifoszfát (dNTP-k) és a hőstabil DNS polimeráz a megfelelő puffer vizes oldatában. A primerek 5' vége által terminált új DNS molekulák szintézise alapvetően három egymást követő lépés, a DNS két szálának denaturációja, a primerek és a komplementer szálak hibridizációja, majd a polimeráz által az új DNS szálak szintézise útján valósul meg. A három lépés együttesét ciklusnak nevezzük, a PCR során általában 30-40 közötti ciklust alkalmaznak. Mivel az egyik ciklusban képződött új DNS szálak már templátként szolgálnak a következő ciklus DNS szintéziséhez, a cél-DNS szakaszok száma hozzávetőlegesen megkétszereződik minden ciklus során. Így egy 30 ciklusból álló reakció körülbelül 2^{30} -szoros (270 milliószoros!) sokszorozást eredményez. A PCR e hallatlan felerősítő képességét először a humán β -globin fehérje DNS szekvenciáinak ill. a sarlósejtes vérszegénység magzatkori kimutatásához használták fel (Mullis et al., 1986; Mullis és Faloona, 1987; Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988).

A reakció fenti leegyszerűsítése ellenére a PCR meglehetősen bonyolult és még ma sem teljes részletében feltárt biokémiai folyamat, melynek kimenetelét a komponensek között kialakuló interakciók kinetikájának folyamatos változásai határozzák meg. Noha a reakciók általában sikeresek, számos paraméter megváltoztatása lehet szükséges, ha még jobb eredményt akarunk elérni, vagy ha a reakció adott esetben teljesen kudarcot vall.

2.1. A PCR LÉPÉSEI ÉS ÖSSZETEVŐI

2.1.1. Minta-előkészítés

A PCR-hez szükséges minta előkészítése során nagy mértékben kihasználható a reakció roppant érzékenysége, vagyis az a képessége, hogy akár néhány kópia is elegendő mintaként szolgálhat kimutatható mennyiségű reakciótermék képződéséhez. Ideális esetben így az előkészítés mindössze néhány (akár egyetlen) sejtnek a reakcióelegyhez történő hozzáadásából áll. Ekkor ugyanis a denaturációs lépés magas hőmérséklete - általában 95°C - elegendő a mintaként szolgáló sejtek líziséhez. Természetesen ez az adott mintától ill. az alkalmazott PCR protokolltól függően az esetek nagy részében jóval összetettebb előkészítést jelent, annál is inkább, mert bizonyos esetekben a PCR nem elég specifikus vagy hatékony, vagy a célszekvenciák nagy mennyiségben jelenlévő zavaró-kísérő DNS tömegében helyezkednek el, ezért az ilyen helyzetekben a reakció végeredménye ("hozama") nagy mértékben függ a kiindulási cél-DNS mennyiségétől a reakcióelegyben.

A már említett legegyszerűbb esetben - vagyis a sejtek hőkezeléssel kiváltott lízisével - a hozzáférhető DNS mennyisége könnyedén növelhető a reakcióelegybe juttatott sejtek számának növelésével. Megfigyelték azonban, hogy amennyiben a hozzáadott sejtek száma 600 fölé emelkedik, a reakció hozama már nem nő szignifikánsan, s 4800 fölött már egyenesen csökkenés tapasztalható (Higuchi, 1989a). E jelenség nagy valószínűség szerint a sejtörmelékben található, a PCR-t gátló anyagok hatásával magyarázható. Vannak azonban olyan felhasználási területei a PCR-nek, ahol ezek a kompromisszumok, vagy inkább korlátozások nem engedhetők meg. Ilyen pl. az, amikor fehérvérsejtek ezrei közül kell a csak néhányban ott rejtőző HIV genomszakaszait felerősíteni (Zimmermann et al., 1996), vagy amikor a transzgenikus élőlényben kutatnak a szintén esetleg csak a sejtek elenyésző hányadában megtalálható idegen gén után, de hasonló a helyzet a csontvelő-átültetési betegek ellenőrzése esetében is (Schlegel et al., 1996).

Ezekre a problémákra olyan eljárások jelentenek megoldást, melyek akár nagyobb tömegű sejtből is szabadítanak ki kellően tiszta DNS-t vagy RNS-t, és kiküszöbölik egyúttal a PCR-hez használt, a *Thermus aquaticus* nevű baktériumból izolált, *Taq* DNS polimeráz aktivitását gátló anyagokat is. A legáltalánosabban használt tisztítási módszerek a következő folyamatsort követik: **detergensekkel oldhatóvá teszik a sejtalkotókat**, majd proteolitikus enzimekkel **megemésztik a fehérjéket**, melyek közül főleg a DNS-hez erősen kötődő hisztonok eltávolítása a legfontosabb. Ezután szerves oldószerekkel **eltávolítják a maradék fehérjéket és membránalkotókat**, majd **alkoholos kicsapással megszabadulnak a szerves oldószertől ill. kicsapott állapotba hozzák a nukleinsavakat**. Sejtmagizoláláshoz jó eredménnyel használhatók a nem-ionos detergensek pl. az NP40 (Higuchi, 1989a).

Szövettenyésztéssel származó sejtekkel vagy mosott perifériás mononukleáris sejtekkel jó eredmények érhetők el a fenti lépéseket használva a tisztításhoz, nem így azonban teljes vérrel, melynek akár 1 µl-re is teljesen blokkolni képes egy 100 µl-es PCR elegyet (Higuchi, 1989a). Egyrészt, olyan kifejezett precipitátum képződik a csőben, melyből a DNS-t képtelenség a polimeráz számára hozzáférhetővé tenni, másrészt kimutatták, hogy a porfirinváz már 0.8 µM mennyiségben is erőteljesen gátolja a PCR-t. Ezért a teljes vér előkészítésének módszere szerint a sejtek ozmotikus lízise után centrifugálással leüleptik a sejtörmeléket és a sejtmagokat, majd a hemoglobint többszöri mosással eltávolítják. Létezik olyan eljárás is, amelyik ötvözi az előbb említetteket: a sejteket hőkezeléssel lizálja, szabaddá téve így a DNS-t, a hemoglobint pedig kicsapja. Ez esetben azonban bizonyos mértékig korlátozott mind a szabaddá tehető DNS mennyisége, mind pedig az a térfogat, amelyet az így feltárt mintából a PCR-hez adhatunk annak gátlása nélkül.

Hasonló elvek érvényesek a szervekből-szövetekből kiinduló minta-előkészítésre is. Optimális esetben akár egyszerű sejt-szövet homogenizátumot is adhatunk mintaként a reakcióelegyhez (Kiss et al., 1996b), gyakrabban azonban itt is kellenek kiegészítő lépések a megfelelő mennyiségű és minőségű kiindulási DNS hozzáférhetővé tételéhez. Ide tartoznak a

szintén detergensen és Proteinase K-n alapuló eljárások, de mellettük ma már egyre több olyan készlet van forgalomban, melyek kiküszöbölik mind a proteolízist, mind a szerves oldószeres kivonást és az alkoholos kicsapást, s ehelyett különféle gyanta ill. szilikon alapú megoldásokkal teszik a PCR-nek megfelelő minőségűvé a minta nukleinsav tartalmát. Ugyanezek, vagy hasonló kitek alkalmasak a már befejezett PCR elegy tisztítására, a maradék primerek, dNTP-k, sók eltávolítására, amennyiben a PCR terméket tovább akarjuk valamilyen molekuláris biológiai vizsgálathoz használni, s e vizsgálatokat gátolnák az említett reakció-maradványok (Smith et al., 1995; Higuchi, 1989a).

2.1.2. A primerek kiválasztása

Annak ellenére, hogy a szintetikusan előállított oligonukleotidok, az ún. primerek kinetikájáról sok adat ismert a hibridizáció során, a megfelelő primerek kiválasztásában még mindig nagy szerep jut bizonyos tapasztalati tényezőknek. A primer-kiválasztás összes, ma alkalmazott szabályainak eleget téve sem garantálható, hogy az adott primer pár megfelelően működni fog akár a legtisztább cél-DNS-en is. Mégis, mivel a PCR specifikusságát csakis és kizárólag a primerek biztosítják (ez egyéb tényezők, mint a Mg^{++} koncentráció csak befolyásolja azt), az alábbi szempontokat feltétlenül figyelembe kell vennünk a tervezésük során.

1. Kerülni kell az ún. szokatlan szekvenciákat, (polipurinok, polipirimidinek) tartalmazó primereket.
2. Különös figyelmet kell fordítani a 3' végükön kifejezett másodlagos szerkezetet tartalmazó primerek elkerülésére.
3. Nagyon fontos, hogy a primer pár két tagja ne tartalmazzon komplementer szekvenciákat, különösen azok 3' végén, az ún. primer-dimerek (lásd később) képződésének elkerülése céljából.

4. A hibridizált primer ill. próba stabilitását fejezi ki az ún. **olvadási hőmérsékleti érték** (T_m), mely mindig az adott primer/próba-cél-szekvencia kapcsolatra vonatkozik, s mely azt a hőmérsékletet adja meg, mely fölött a hibridizált szakaszok szétválnak egymástól. A T_m Meinkoth és Wahl (1984) egyenletéből számolható:

$$T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6 (\log M) + 0.41 (\%GC) - 0.61 (\%form) - 500/L$$

ahol M a monovalens kationok molaritását, $\%GC$ a guanin és citozin nukleotidok százalékos arányát a DNS-ben, $\%form$ a formamid százalékos arányát az oldatban, L pedig a hibridizálandó szakaszok bázispárokban megadott hosszát jelöli. (Megjegyzendő, hogy az egyenletnek létezik egy bővítettebb formája, amely számol a cél-szekvencia és a primer szekvenciája közötti nem megfelelő komplementaritású nukleotidokkal is.)

A gyakorlatban azonban ettől egy egyszerűbb képletet alkalmaznak, az alábbiak szerint (Suggs et al., 1981): $\text{primer } T_m = 2^\circ\text{C} (A+T) + 4^\circ\text{C} (G+C)$

Minél nagyobb T_m értéke van egy primernek egy adott cél-DNS-re vonatkozóan (egy másik primerhez viszonyítva), annál nagyobb specificitás érhető el a használata során.

Fontos az is, hogy a primer lehetőleg ne a cél-DNS egy bonyolultabb másodlagos szerkezetű szakaszára legyen komplementer. Azokban az esetekben viszont, amikor az adott mikroorganizmusra nézve csak korlátozott szekvencia adatok állnak rendelkezésünkre, és fontos lehet a PCR mielőbbi alkalmazása, bátran próbára kell tenni ezeket a primereket is, szerencsés esetben működni fognak.

Kritikus tényező a **primerek hosszúsága** és a reakcióban használt **menyisége** is. A legtöbb primer 20-30 nukleotidot tartalmaz, ezeknél hosszabbakat is lehet alkalmazni természetesen, de ez ritkán szükséges. Bizonyos esetekben azonban kedvező lehet, ha módosítjuk a PCR során keletkezett reakcióterméket - restrikciós endonukleázok vágáshelyeit, promoter szekvenciákat építhetünk a szintetizálódó termékekbe a primerek 5' végéhez kapcsoltnak, így azok a PCR során beépülnek az új DNS szálakba. Szükség lehet ugyanakkor rövidebb vagy éppen **degenerált primerek** alkalmazására is. Ez utóbbi azt jelenti, hogy bizonyos, meghatározott

nukleotidok helyére a primer szintézis során a 4 nukleotid közül nem csak egy épülhet be, hanem a degeneráltság fokától függően kettő, három, vagy akár mind a négy nukleotidból épülhet be valamelyik az adott pozícióba. A primer specifikussága így kontrolláltan csökkenthető, lehetővé téve így szélesebb körű felhasználását, például mikroorganizmusok nagyobb rendszertani egységhez tartozó csoportjának kimutatását ugyanazokkal a primerekkel (lásd Kiss et al., 1996a). Mivel az ilyen primerek kevésbé stabilan hibridizálnak a nem teljesen komplementer szekvenciákhoz, a hőmérsékleti paramétereket körültekintően kell az adott alkalmazáshoz igazítani. Figyelembe véve a DNS szintézis szabályait, itt is nagyon fontos, hogy még az erősen degenerált primerek esetében is a 3' vég lehetőleg ne tartalmazzon degenerált nukleotidokat (Saiki, 1989).

A primerek koncentrációja általánosságban 0.05-0.5 μM között változik a PCR elegyben.

A primer-dimer képződés gyakran észlelt mellékterméke a PCR-nek, különösen azokban az esetekben, amikor kevés cél-DNS-t tartalmazó reakcióelegyben nagy ciklusszámú reakciót hajtunk végre. A primer-dimer egy duplaszálú fragment, melynek hossza közel egyenlő a két primer együttes hosszával, és úgy keletkezik, hogy az egyik primerről kiindulva a polimeráz a másik primeren szintetizálja meg az új szálát. A keletkezett "termék" nagyon kedvező templát a polimeráz számára, s ha valamelyik kezdeti ciklusban képződik, akár az egész reakcióban csak a dimer formátumok szintézise játszódik le.

A primer-dimer formáció kialakulásában több tényező is szerepet játszik. Az egyik legfontosabb ezek közül a komplementer 3' véggel rendelkező primerek egyidejű jelenléte a reakcióelegyben. Ezek átmenetileg összekapcsolódva kitűnő templátot alkotnak a polimeráz számára. Ugyanakkor számos polimeráz, mint például a *Taq* polimeráz is, rendelkezik egy templáttól független polimerizációs aktivitással is, mely a tompavégeket egészíti ki egy vagy több nukleotiddal, vagy a duplaszálú DNS-en előforduló folytonossági hiányokat (egyszálú szakaszokat) "foltozza be" (ún. repair aktivitás). Ha a polimeráz az egyszálú primereket egészíti ki néhány nukleotiddal az említett mechanizmus segítségével, könnyen van esély arra, hogy rövid,

komplementer végek alakuljanak ki a primerek végein, s beindítsák a dimerizációt. A dimereket nyilván érdemes kiküszöbölnünk. Ha új primer választása nem járható, az enzim ill. a primerek mennyiségének minimalisra szorításával szinte minden esetben csökkenthető a képződésük.

Bár a legtöbb primer működőképesnek bizonyul - igaz, gyakran nagyon különböző mértékben - a PCR során, vannak primerek, melyek a leggondosabb kiválasztás ellenére sem eredményeznek PCR terméket. Ennek oka még nem világos, tény azonban, hogy a primerek néhány bázissal való "odább-csúsztatásával" a probléma a legtöbb esetben megoldódik (Saiki, 1989, 1990).

Szerencsére a primer tervezés folyamata mára már egyáltalán nem olyan fárasztó és bonyolult dolog, mint ahogy az a fenti, rövidített listából kitűnhetne. Számos kitűnő szoftvert fejlesztettek ki erre a célra az elmúlt években, melyek gyorsan és megbízhatóan végzik el a szükséges analíziseket, s a legtöbbjük már a Interneten is hozzáférhető (Lowe et al., 1990; Montpetit et al. 1992).

2.1.3. A DNS-PCR puffere

A legáltalánosabban használt, tízszeresen koncentrált **PCR puffer** a következőkből áll (Saiki, 1989): 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, és 100 mM Tris-HCl, pH 9.0. Az alkalmazott polimeráz pH optimumát be kell tartani, ezért sem ajánlják a gyártók a különböző enzimekhez készített pufferek cserélgetését. A PCR puffer összetételének változásai jelentős befolyással vannak a reakció kimenetelére, ezen belül is a **Mg⁺⁺ ion** az, aminek koncentrációja döntő hatást gyakorol a reakció specifikusságára ill. hozamára. 1.5 mM MgCl₂ koncentráció általában optimális (200 μM dNTP koncentráció mellett), de néhány esetben ettől eltérő Mg⁺⁺ koncentrációra van szükség. Általánosságban megállapítható, hogy a Mg⁺⁺ fölös mennyisége a nem-specifikus termékek fölhalmozódásához vezet, míg a nem kielégítő Mg⁺⁺ koncentráció a reakciótermék mennyiségének csökkenését vonja maga után. Kimutatták, hogy bizonyos alkalmazásokhoz a KCl elhagyása a reakcióelegyből javított a PCR-en (Saiki, 1989).

Vannak olyan protokollok, melyek 10% **dimetil-szulfoxidot** (DMSO) ajánlanak a reakcióelegybe az egyszálú DNS másodlagos szerkezetének megszüntetéséhez. Ugyanakkor ismert, hogy a DMSO kissé gátlón hat a *Taq*-ra és csökkenti a reakció hozamát, különösen akkor, ha ún. GC-gazdag (>55%) szekvencia a megsokszorozandó darab. Ilyen GC-gazdag szekvenciákhoz 10% **formamid** használatát javasolják, mely kiküszöböli az egyébként gyakran megfigyelt nem specifikus termékeket és javítja a reakció hatékonyságát (Sarkar et al., 1990).

A dNTP-k, melyek egyébként igen bomlékony vegyületek, általában 50-300 μM koncentrációban kerülnek a reakcióelegybe. A magasabb koncentrációk alkalmazása nem ajánlott, az esetleges hibás beépítések gyakoriságának növekedése miatt (Saiki, 1989).

Minthogy a dNTP-k képesek a Mg^{++} -ionok 1:1 arányú megkötésére, mennyiségük meghatározza a reakcióelegyben található szabad Mg^{++} -k mennyiségét is. Ha tehát bármilyen koncentrációváltozást tervezünk a dNTP-eket illetően, mindig figyelembe kell venni ennek a Mg^{++} koncentrációra kifejtett hatását is (Innis és Gelfand, 1990).

2.1.4. A PCR során használt enzimek

Kezdetben az *E. coli* DNS polimeráz **I. Klenow fragmentjét** használták a PCR-hez (Saiki et al, 1988). Minthogy ez az enzim nem hőstabil, a denaturációs lépések során rendre inaktiválódott, ezért minden egyes ciklus után friss enzimet kellett a reakcióelegyhez adni. További gondot jelentett az is, hogy a 37°C-on optimálisan működő Klenow fragmenttel végzett PCR specifikussága kívánivalókat hagyott maga után, a milliószorosra sokszorosított PCR termékek nagy hányada ugyanis nem a keresett fragment volt.

A Yellowstone Nemzeti Park egyik hőforrásában felfedezett (Brock és Freeze, 1969), 70-75°C-on is szaporodni képes eubaktériumból, a *Thermus aquaticus*-ból izolált **hőstabil Taq DNS polimeráz** bevezetése a PCR-be azonban forradalmasította a technikát, leegyszerűsítette, meggyorsította azt, s egyszersmind lehetővé vált a reakció automatizálása is. A reakcióelegy összetevőit csak egyszer kellett ezután összerakni, s a csövek további felnyitás nélkül bekerültek

az ún. thermocyclerbe (programozható termosztát), ahol egyszerűen a hőmérsékleti ciklusok folyamatos ismétlésével végbement a reakció (Gelfand, 1989).

A *Taq* DNS polimeráz aktivitását jelentősen befolyásolja mind a Mg^{++} -ionok, mind pedig a monovalens kationok **koncentrációja**, ill. ez utóbbiak minősége. Általánosságban elmondható, hogy 2.0 mM Mg^{++} maximálisan stimulálja a *Taq* polimeráz aktivitását (0.7-0.8 mM együttes dNTP koncentráció mellett). Magasabb Mg^{++} koncentrációk már gátló hatásúak az enzim aktivitására, 10 mM $MgCl_2$ 40-50%-os aktivitás csökkenést eredményezhet (Saiki, 1989).

A *Taq* polimeráz specificitását, hatékonyságát, így többek között a keletkező PCR-termékek radioaktív vagy biotinilált nukleotiddal történő jelölését nagyban elősegíti, ha a **dNTP-k alacsony koncentrációban vannak jelen** a reakcióelegyben. Egy 100 μ l-es PCR-elegyben dezoxinukleotid-trifoszfátonként alkalmazott 40 μ M dNTP mennyiség elegendőnek bizonyult 2.6 μ g DNS szintéziséhez, s a rendelkezésre álló nukleotidoknak csak a fele épült be az újonnan szintetizálódott DNS szálakba (Gelfand, 1989). Mindazonáltal a nagyon alacsony dNTP koncentrációk már kedvezőtlen hatást gyakorolnak az enzim működésére.

A *Taq* DNS polimeráz nem rendelkezik korrekciós, ún. **proof-reading aktivitással**. Az enzim ugyanakkor rendelkezik - az egyéb DNS polimerázokhoz hasonlóan - **5'-3' exonukleáz aktivitással**, mellyel eltávolítja a szintetizálódó szál előtt helyezkedő láncot a templátról (Gelfand, 1989).

A *Taq* DNS polimeráz rendelkezik egy érdekes és gyakran kihasznált tulajdonsággal, egy **templáttól független terminális transzferáz** aktivitással, mellyel egyetlen nukleotidot (általában adenozint) ad a PCR-termékek 3' végéhez. Ez azonban nem egy feltétlenül végbemenő reakciót jelent. Kimutatták ugyanis, hogy a primerek 5' végén található nukleotidok minősége jelentősen befolyásolja ezt a lépést, mégpedig a következők szerint: a primer 5' végén található G-nal szemben beépített C-hoz (mely a PCR-termék 3' végén van tehát) kapcsol leggyakrabban egy A-t az enzim, míg legritkábban a 3' végi A-hoz (ami a primer 5' végén elhelyezkedő T-t jelent). Az

ún. T/A klónozási kísérletekhez használt primerek tervezésénél ezt is célszerű figyelembe venni, a primertervezés már említett általános szabályain kívül (Brownstein et al., 1996).

Egy átlagos, 100 μ l-es PCR reakcióban általában **2.5 egység (U) *Taq* polimerázt** használnak, bár az adott körülményektől (elsősorban a cél-DNS komplexitásától) függően ez 1 és 4 U között változhat. Az ezeket az értékeket meghaladó enzim mennyiség nem ajánlatos, mivel elősegítheti nem-specifikus reakciótermékek képződését, felhalmozódását (Gelfand, 1989).

A *Thermus aquaticus*-ból izolált DNS polimerázon kívül számos más *Thermus* fajból, a *Bacillus stearothermophilus*-ból ill. egyéb, archeabaktériumokból is vontak ki hőstabil DNS polimerázt, s ezek közül többet jellemeztek is. A *Taq* DNS polimeráz is hozzáférhető ma már nem csak izolált és tisztított, hanem klónozott formában is (Hinnisdaels et al, 1996; Kobs, 1997; Miller és Storts, 1995).

Ahogy azt már említettem, a *Taq* DNS polimeráz néhány ezer nukleotid hosszúságú szál szintézisére használható megbízhatóan. Ma azonban gyakran több 10 ezer bázispár hosszúságú szakaszok megsokszorozása a cél (ún. **hosszú PCR**, vagy Long and Accurate PCR). Ilyen alkalmazásokhoz vagy két enzim keverékét használják, melyek közül az egyik nagy aktivitással, a másik pedig erős proof-readinggel bír, vagy pedig egyetlen (általában klónozott *Taq* polimerázzal) érik el az akár 35 ezer bp hosszúságú fragment megsokszorozását (Hengen, 1994).

Céljainktól függően tehát kétféle szempontot követve választhatunk enzimet a PCR-hez: diagnosztikai célokra megfelelőbb a jó hozamú (pl. *Taq*), míg a későbbi klónozási, szekvenálási kísérletek elvégzéséhez a nagyon pontos (erős "proof-reading" aktivitással bíró) enzim (pl. *Pwu*, *Pfu*, ill. *UITma* DNS polimeráz; Stock et al., 1995).

2.1.5. A ciklusok paraméterei

A PCR alapvetően három lépésből álló ciklusok egymás utáni ismétléséből áll, a **denaturációból**, a **primerek hibridizációjából** és a **nukleotidláncok szintéziséből**. Mindegyik lépéshez egy meghatározott hőmérsékleti érték tartozik, melyet biztosíthatunk 3 vízfürdővel,

ahogy az a PCR alkalmazásának kezdetén az egyedüli lehetőséget jelentette, vagy pedig gépi úton, ahol a mintákat tartalmazó blokk hőmérséklete mikroprocesszorok által vezérelve változik.

Egy tipikus PCR során a denaturáció a csövek rövid ideig tartó 90-95°C-ra melegítésével, a primerek hibridizációja 40-60°C közötti hőmérsékleten, a primerekről kiinduló DNS polimerizáció pedig 70-75°C-on valósul meg. Ez utóbbihoz szükséges idő a szintetizálandó termék hosszától függ: 1 perc bőségesen elegendő 1000 bázispár szintéziséhez, kezdetnek ez egy megbízható érték (Saiki, 1989).

Ha a reakció egyéb paramétereit már beállítottuk, megvizsgálhatjuk a szintézis időtartamának lerövidítési lehetőségeit is. Rövid, 150 bp hosszúság alatti fragmentek szintéziséhez ki is hagyható a ciklus 3. lépése; a denaturáció és a primerek hibridizációja közötti hőmérséklet változás ugyanis elegendő időt hagy a polimeráz számára egy rövid szakasz megszintetizálásához. Ez az említett időtartam (ti. amíg a gép az egyik hőmérsékleti értékről a másikra fűt ill. hűt) az ún. ramp idő, az esetek nagy részében nem befolyásoló tényező, ezért minden gépen (ha van rá lehetőség) célszerű a leggyorsabb ramp időt beállítani. Nagyon hosszú fragmentek esetében azonban szükség lehet a ramp idő nyújtására.

A PCR kudarcának egyik hétköznapi oka a **reakcióelegy elégtelen felmelegítése** a denaturáció alatt. Alapvető ugyanis, hogy a DNS templát két szála tökéletesen elváljon egymástól, lehetővé téve a primerek számára a hibridizációt. 94°C erre a célra tökéletesen megfelel, s nem is kell sokáig ezen a hőmérsékleten tartani a reakcióelegyet, hogy a polimeráz aktivitásából minél többet és minél tovább megtartsunk a PCR során.

A primerek hibridizációjának (az angolul annealingnek nevezett lépés) hőmérséklete a **primerek hosszától és GC tartalmától függ**. Egy 20 nukleotidból álló és 50% GC tartalommal rendelkező primer párhoz az 55°C jó kiindulási pont, s az esetek többségében nem is kell rajta változtatni (Saki, 1989). Az elérni kívánt specificitás érdekében azonban növelhető ill. csökkenthető az annealing hőmérséklete. Minthogy a primerek óriási túlsúlyban vannak a reakció elején a templát molekulákhoz viszonyítva, az annealing szinte azonnal megtörténik a denaturáció

után (ahogy persze a hőmérséklet eléri az ehhez szükséges legalacsonyabb szintet), ezért nem feltétlenül kell hosszú időket alkalmazni az annealinghez. A termosztátokon általánosan alkalmazott 20-30 másodperces idő tulajdonképpen ahhoz kell, hogy egy 100 µl reakcióelegy a 0,5 ml-es PCR-csőben elérje az adott inkubációs hőmérsékletet.

A PCR során alkalmazott hőmérsékleti ciklusok során fellépő, a párolgásból eredő veszteségeket vagy a reakcióelegy tetejére csöppentett olajjal, vagy fűthető tetejű thermocyclerek alkalmazásával előzik meg.

Optimális körülmények között (egymással nagy mértékben vagy tökéletesen komplementer primer és templát szekvenciák esetén) lehetőség nyílik az ún. **két lépéses ciklus** alkalmazására, ami azt jelenti, hogy az annealing és a szintézis egy hőmérsékleten játszódik le, ami általában 55°C fölött van (Saiki, 1989).

Említést érdemel még az ún. touch down PCR, mely során néhány (általában 5), magasabb hőmérsékletű annealinget alkalmazó ciklussal kezdik a PCR-t a specifikusabb szekvenciák fölerősítésének elindításához, majd a hátralévő (általában 30) ciklusokban alacsonyabb annealing hőmérsékletet alkalmazva érik el a reakció (immár túlnyomóan a specifikus terméket szintetizáló) jobb kitermelését.

2.2. A "PLATEAU" JELENSÉG

A PCR folyamán végbemenő sokszorozási folyamat nem végtelen. Bizonyos számú ciklus után a reakciótermékek felhalmozódási üteme fokozatosan lassul, majd elér egy lineáris fázist, vagyis nem nő tovább. A reakciónak ezt a szakaszát hívjuk plateau-nak. Az, hogy mikor éri el a reakció ezt a fázist, alapvetően a cél-DNS **kiindulási kópiaszámától** és a reakció során újonnan **keletkezett DNS mennyiségétől** függ. Ebből következően csak úgy jellemezhetjük valamely PCR protokoll teljesítőképességét, ha pontosan megadjuk a templát kiindulási kópiaszámát is.

A plateau fázis elérésének leggyakorlatiasabb okain túl, mint a primerek ill. dNTP-k elfogyása, vagy a polimeráz és a dNTP-k inaktiválódása, - melyek egyébként nem jellemzőek egy átlagos PCR-re - van még 3 nagyon fontos tényező, melyek figyelmet érdemelnek a folyamat

szempontjából: a szubsztrát túlsúlya a reakcióelegyben, a nem specifikus termékek által kiváltott kompetíció, és a termékek reasszociációja.

A **szubsztrát molekulák túlsúlya** azon egyszerű oknál fogva alakulhat ki, hogy mintánk nagy mennyiségben tartalmazott cél-DNS-t, ezért sokkal több PCR termék szintetizálódott már a reakció korai szakaszában, mint amennyit a rendelkezésre álló enzim mennyiség szubsztrátként tudna használni a rákövetkező polimerizációs lépések alatt. Áthidalható az ilyen jellegű probléma **az enzim mennyiségének, vagy a polimerizációs idő hosszának a növelésével**. Egyik sem igazán gyakorlatias, mert minden következő ciklus vagy az enzimből, vagy az extenziós időből igényelne kétszer annyit, mint az előző folyamán ahhoz, hogy a reakció exponenciális jellege megmaradjon. Egyszerűbb megoldás a **minta hígítása**.

A **nem specifikus termékek által kiváltott kompetíció** jellegében nagyon hasonló a szubsztrát túlsúly problémához. Ebben az esetben a nem specifikus és a specifikus termékek versengenek a limitált mennyiségben jelen lévő enzimért. A probléma értelemszerűen a **reakció specificitásának növelésével**, például az annealing hőmérsékletének emelésével küszöbölhető ki.

Akadályozhatja a PCR termékek további keletkezését az is, ha a már nagy tömegben jelenlévő **egyszálú PCR termékek duplaszálúvá tapadnak össze (reasszociálnak)**, mielőtt a primerekről kiinduló DNS szintézis megkezdődhetne. Megoldást itt is a **reakcióelegy hígítása** nyújthat.

A plateau fázis a PCR természetes velejárója. Az esetek döntő többségében azonban mire a reakcióelegy eléri ezt a fázist, már elegendő specifikus PCR termék halmozódik fel, aminek akár kimutatása, akár pedig a vele való további kísérletek, vizsgálatok elvégzése egyszerű feladat. Azokban a kis számú esetekben pedig, amikor a plateau igazán gondot jelent, célszerűbb **több PCR kivitelezése egymás után**, mint megkísérelni a plateau fázis áthidalását vagy késleltetését (Saiki, 1989).

2.3. A SPECIFICITÁST BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK

Ahogy az a fentiekből is kitűnik, a polimeráz láncreakció primerek által meghatározott specifikusságát számos tényező befolyásolhatja. A legfontosabbak ezek közül a következőkben összegezhetők:

A reakció kimenetelére döntő befolyással bír az **annealing hőmérséklete**. Az **annealing**, valamint a **szintézis idejének** a lehetőségek szerinti **minimalizálásával** elkerülhető nukleotidok hibás beépítése, így a nem specifikus termékek keletkezése. Hasonló eredményre vezet a **primerek és az enzim koncentrációjának** a lehető **legalacsonyabbra szorítása**, ahogy a primer-dimerek képződésének kiküszöbölésénél már említettük. Végül, de nem utolsó sorban, mind a **Mg⁺⁺-k**, mind a **KCl koncentrációjának optimalizálása** nagyban fokozza a reakció specifikitását az enzimre gyakorolt közvetlen hatásukon keresztül (Saiki, 1989).

2.4. A PCR TERMÉKEK KIMUTATÁSA

A PCR termékek kimutatására legáltalánosabban használt módszer az **agaróz gélelektroforézis**. Az elektroforézis során a **DNS molekulák méretük szerint választódnak szét**. A gél matrix ugyanis molekuláris szűrőként viselkedik, melyben a kisebb fragmentumok gyorsabban vándorolnak, mint a nagyobb méretűek. Egy fragment által megtett távolság így fordítottan arányos annak méretével. Az agaróz matrix 100-50,000 nukleotid hosszúságú fragmentek szétválasztására a legalkalmasabb. A szétválasztás finomítható az agaróz koncentrációjának helyes megválasztásával: az alacsony (0.3%) koncentráció a nagyobb fragmentek, a magasabb (~ 2%) koncentráció a kisebb fragmentek szétválasztását teszi **hatékonyabbá** (Westermeier, 1993).

Az agaróz gélben méretüknek megfelelően szétvándorolt **DNS molekulák megfestésére** általánosan egy fluoreszkáló festéket, az **etidium-bromidot** használják, mely az ultraibolya (UV) **fény** tartományában válik láthatóvá. Az UV fény hatására az azonos méretű DNS molekulák **sokasága** kompakt csíkok formájában láthatók a gélben, melyekről fénykép ill. videofelvétel

készíthető az eredmény megőrzése ill. további analízise céljából. A rendelkezésre álló szoftverek segítségével a videokamerával rögzített s digitalizált képek standardizálhatók, lehetővé téve így térben és időben egymástól elkülönülten végrehajtott kísérletek eredményeinek összevetését. Kiterjedten használják ezt a fajta képelemzést a genotípus azonosító vizsgálatok során. A módszer érzékenységének alsó határa kb. 5 ng DNS.

Az agaróz gélelektroforézis mellett a **poliakrilamid-gélelektroforézist** (PAGE) is használják a PCR termékek szeparálására azokban az esetekben, amikor nagy felbontóképességű elválasztásra van szükség, mint például a Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) analízisek esetében (Selvakumar et al., 1997) Ez utóbbi során a duplaszálú PCR termékeket denaturálják és koncentrált poliakrilamid gélben futtatják. A szimplaszálú DNS fragmentek nukleotidsorrendjüknek megfelelő konformációt felvéve már akár 1 nukleotid eltérés esetén is megváltozott futási karakterisztikát mutatnak (általában max. 300 nukleotid fragment hosszúságig).

Az utóbbi években azonban a gélelektroforézisen alapuló kimutatás számos **hiányosságára** figyeltek fel. Rögtön az elsők között az agaróz gélelektroforézis-etidium-bromid rendszer **érzékenységét** kritizálták (Lazar, 1994), de a hagyományos kimutatási eljárás **nem bizonyult** minden esetben **kielégítően specifikusnak** sem. Ilyen eset például a klinikai minták vizsgálata során gyakran megfigyelt több csík vagy az ún. smear - elmosódott folt a kompakt csík helyett - a gélen.

Nemrégiben bevezettek azonban egy új festéket, a **SYBR Green I-t**, amely kivételesen erős affinitással rendelkezik a DNS iránt, és a fénykibocsátása is legalább ötszöröse az etidium-bromidénak. A potenciálisan karcinogénnek tartott etidium-bromidtól eltérően ez a festék teljesen ártalmatlannak bizonyult, így nem meglepő, hogy alkalmazása gyorsan terjed azokon a területeken, ahol a PCR termékek nagyon érzékeny kimutatására van szükség (Schneeberger et al, 1995).

Az előbb említett festéken túl két egyéb, még hatékonyabb megoldást használnak az **érzékenység és a specificitás fokozására**, valamint a **termékek valóságának bizonyítására (verifikálására)**.

Az egyik eljárás során, melyet kidolgozójáról **Southern-hibridizációnak** neveztek el (Southern, 1975), a PCR termékeket denaturálás után vagy vákuummal vagy a kapillaritás elvét kihasználva a gélből egy nylon membránra juttatják (blottolják), ott rögzítik, és egy a termékre specifikus, radioaktívan vagy egyéb módon jelölt próbával hibridizáltatják. Megfelelő hibridizációs körülmények között a reakció kizárja a nem specifikus szekvenciák kimutatását. Bár a radioaktívan jelölt, ill. az enzimesen jelölt és kemilumineszcenciával kombinált kimutatási módszerek roppant érzékenyek, meg kell említeni jelentős munka- és időszükségletüket, valamint azt, hogy a radioaktív próbák használatát számos labor - különösen rutindiagnosztikai labor - nem engedheti meg magának a szükséges feltételek hiánya miatt.

Számolva az etidium-bromidos festés érzékenységi és specificitási problémáival, kidolgoztak egy csak a PCR továbbfejlesztésén alapuló technikát, ami jelentősen növelni képes mind az érzékenységet, mind a specificitást. Az ún. **nested (fészkes) PCR** során az első reakció a hagyományos módon zajlik, majd a kész reakcióelegy egy kis hányada (ill. az abban található PCR termék) szolgál cél-DNS-ként egy második PCR-ben, csak hogy az ebben alkalmazott primer pár az eredetin belül, azok által közrefogva helyezkedik el. Így kivételes érzékenység és specificitás érhető el, hisz a PCR potenciálja kétszeresen is kihasználásra kerül a nested PCR-ben. Épp a rendkívüli érzékenység az egyik hátránya a módszernek, ugyanis fokozottan jelentkezik a kontamináció veszélye, másrészt hosszadalmasabbá és költségesebbé is válik így a reakciók kivitelezése (Belák és Ballagi-Pordány, 1993).

Az említett hátrányokat kiküszöbölendő, olyan új kimutatási eljárásokat fejlesztettek ki, melyek mind érzékenységben, mind specificitásban jelentősen felülmúlják a hagyományos módszereket. Ezek a technikák képesek akár 10-nél kevesebb kiindulási kópiaszámú cél-DNS-ből keletkezett PCR termék kimutatására néhány ciklus után is. A kimutatás ráadásul rendkívül

specifikus, sem primer-dimereket, sem egyéb, nem-specifikus termékeket nem észlel, s a módszerbe beépíthető dekontamináló eljárások a nested PCR-nél említett hátrányokat is kiküszöbölik.

Egyike a legígéretesebb ilyen technikáknak az **ELISA-t** (Enzyme-linked immunosorbent assay) felhasználó eljárás, már csak azért is, mert az ELISA-k már kellőképpen standardizált, a legtöbb laborban rutinszerűen használt technikák. Az ELISA mellett a **HPLC** (high performance liquid chromatography) és a **kapilláris elektroforézis** azok a módszerek, amelyek felválthatják az etidium-bromidon alapuló hagyományos kimutatási protokollokat (Lazar, 1994; Oefner et al., 1994).

2.5. A PCR SORÁN ALKALMAZOTT KONTROLLOK

A PCR kivételes érzékenysége miatt elkerülhetetlen a megfelelő pozitív ill. negatív kontrollok alkalmazása a reakciókhoz - különösen igaz ez a diagnosztikai célú felhasználásokra. A **negatív kontroll** arról ad felvilágosítást, hogy történt-e kontamináció a reakció kivitelezése során, s legegyszerűbben desztillált vízzel helyettesített cél-DNS-t, vagy cél-DNS-t biztosan nem tartalmazó minta felhasználását jelenti a PCR-ben.

A **pozitív kontroll** azt mutatja meg, hogy a rendszer az elvártan megfelelően működött-e. A pozitív kontroll lehet külső ill. belső. A legegyszerűbb **külső pozitív kontroll** az, amikor biztosan pozitív (cél-DNS-t tartalmazó) mintát is vizsgálunk a PCR során úgy, hogy egy külön csőben futtatjuk le a pozitív kontrollt. A **belső pozitív kontroll** esetében pedig a pozitív mintát hozzákeverjük valamelyik, a vizsgálandó anyagot tartalmazó csőhöz, lehetőség szerint annak különböző hígításaihoz. Ezáltal felvilágosítást nyerünk arról is, hogy a vizsgálandó minta nem tartalmaz-e a PCR-t gátló anyagokat. Értelemszerűen azokban a csövekben, amelyekben a pozitív kontroll található, mindig pozitív reakciót kellene kapnunk, de gyakran előfordul, hogy ezt csak a vizsgálandó anyag akár 100-10,000-szeres hígítása mellett észleljük, ami azt jelenti, hogy mintánk nagy töménységben tartalmaz gátló anyagokat. A legtöbb diagnosztikai célú PCR-hez az ilyen jellegű pozitív kontrollok általában megfelelőek.

A belső pozitív kontrolloknak két fajtája létezik, az endogén és az exogén. Az **endogén belső pozitív kontroll** olyan szekvenciákat jelentenek, amelyek eredendően benne vannak a vizsgálandó mintában, mint például az ún. háztartási gének (az alapvető anyagcsere-folyamatokban részt vevő enzimek génjei). Ezeket a szekvenciákat egyszerre sokszorozzuk meg a cél-DNS-ével (és persze teljesen más primer párral), így hiteles információt nyerünk a minta-előkészítés és tisztítás hatékonyságáról. Az **exogén belső pozitív kontroll** (az ún. MIMIC) egy szintetikus kontrollt jelent, mely ugyanazokat a primer-kötő szekvenciákat tartalmazza, mint a cél-DNS, s itt a kontrollról a specifikus fragmenttől csupán méretében különböző PCR-termék képződik. Ezek a kontrollok természetükből fakadóan tisztított formában kerülnek alkalmazásra - gyakran néhány plazmidról van szó - ezért nem a tisztítás hatékonyságát hivatottak ellenőrizni, hanem főleg kvantitatív reakciókhoz veszik őket igénybe. Nagyon fontos, hogy a méretkülönbség nyilvánvaló legyen a kontroll és a cél-fragment között, de ne legyen túl nagy, hogy a kinetikai paramétereik ne különbözzenek túlságosan.

2.6. KONTAMINÁCIÓ

Rendkívüli hatékonysága miatt a PCR végrehajtása során rendkívüli figyelmet kell fordítani az esetleges kontamináció - olyan nukleinsav molekulák kimutatása, melyek eredendően nem voltak jelen a mintában - elkerülésére. A legfontosabb szabályok a következők.

A minta, valamint a PCR-hez szükséges vegyszerek előkészítése, a reakcióelegy összeállítása **ne történjen ugyanabban a helyiségben**, ahol a PCR termékek analízise, tárolása, további feldolgozása folyik. A legkönnyebben kontamináló anyag ugyanis nem a minta DNS tartalma, hanem a PCR termék, hiszen óriási tömegben van jelen parányi térfogatban, és kitűnő "alapanyag" a további PCR-ekhez. Ezért az alapvető munkafolyamatokat külön helyiségben kell elvégezni (mintafeltárás, a reakcióelegy összeállítása, a minta hozzáadása és a reakció lefuttatása, elektroforézis-géldokumentáció), sőt, ha lehet, a minta preparálása és a reakcióelegy összeállítása **ügynevezett lamináris boxban** történjen, amely megakadályozza, hogy kívülről szennyező anyag jusson a box légterébe, s a fülkében elhelyezett UV lámpa, mely intra- és inter-strand pyrimidin-

diméreket alkotva redukálja a kódoló kapacitást. Poliszitirén anyagból készült pipetták esetében ugyanakkor ügyelni kell arra is, hogy a pipetták ne legyenek 48 óránál tovább kitéve az UV hatásának, mert a PCR-t erőteljesen gátló anyagok felszabadulását eredményezheti a tartós UV hatás (Linguist et al., 1998). A reagensek tárolására, de főleg a velük való munka során **lehetőleg steril, egyszer használatos műanyag eszközöket** használjunk; az üvegeszközök csak nagyon alapos tisztítás után használhatók a kontamináció veszélye nélkül. A pipettázás igen jelentős forrása a kontaminációnak, ezért csakis **egyszer-használatos, steril pipettahegyek** használata megengedett. Kaphatók ún. pozitív kizorítású pipetták, amelyek nagyon hasznosak ugyan, de igen drágák, valamint filterrel ellátott pipettahegyek, amelyek a pipettázás során esetelegesen kialakult légörvények közvetítette kontaminációt is kizárják.

A PCR-hez mindig steril, és kis adagokban tárolt (általában 10 reakcióra elegendő) vegyszereket használunk. A munkafolyamatokat eldobható, egyszer-használatos **kesztyűben** végezzük, melyeket ajánlatos sűrűn (a már említett fázisonként) cserélni.

A nyitott Eppendorf csövek gyakran kontaminálódnak a folyadékokkal való foglalatosság közben keletkező **aerosolok** közvetítésével. A PCR során különösen fontos, hogy azok a csövek legyenek nyitva, amelyekkel éppen dolgozunk. Ebből a szempontból is (és takarékosági okokból is) ajánlatos ún. master-mixet készíteni, ami azt jelenti, hogy egy csőbe (persze a kísérlet volumenétől függően) összemérjük az összes cső anyagszükségletét a DNS (és bizonyos esetekben az enzim) kivételével, majd ebből a csőből mérjük szét a megfelelő térfogatokat, **minimalizálva** ezzel a pipettázási veszteségeket is. A PCR munkafolyamataihoz ajánlott egy **külön** erre a célra használt **mikrocentrifugát** alkalmazni. A **megfelelő kontrollokat** már ismertettem az előző fejezetben. A fentieken kívül **számos forrása** lehet a kontaminációnak, de a **legjelentősebb** ezek közül a kontakt kontamináció. Ezért különös gondot kell fordítani az összes **laboreszközre**, amelyek érintkezésbe kerülhetnek a PCR vegyszereivel, s nem utolsósorban a PCR-t kivitelező személy is szóba jöhet, mint a kontamináció közvetítője (Belák és Ballagi-Pordány, 1993).

3. RNS KIMUTATÓ PCR (RT-PCR)

Napjainkra a PCR egyik fő felhasználási területévé vált a génkifejeződés tanulmányozása. E vizsgálatok során a szintetizálódott mRNS molekulákat mutatják ki a PCR segítségével. Mivel a PCR csak DNS-ből DNS-t sokszoroz meg, az RNS-t cDNS-sé (c=copy, másolat) kell átírni, amit reverz transzkriptáz segítségével végezhetünk el. Innen kapta az eljárás nevét is: RT-PCR. A módszer rendkívül hasznosnak bizonyult azokban az esetekben, amikor a hozzáférhető minta mennyisége és/vagy az abban található mRNS mennyisége nagyon alacsony. Az utóbbi időben viszont egyre nagyobb szerepet kapott az RT-PCR az RNS vírusok kimutatásában, akár mennyiségi vonatkozásban is (Berencsi és Minárovits, 1997).

Az RT-PCR sikeres végrehajtásához a legfontosabb tényezők a kimutatandó RNS minősége, az átíráshoz használt enzimek, és a reakciókban alkalmazott primerek.

3.1. AZ RNS MINŐSÉGE

A megfelelő minőségű és mennyiségű cDNS szintéziséhez elengedhetetlen, hogy a minta RNS-tartalmát nagy tömegben, tisztán, koncentrált formában izoláljuk. Minthogy ebben az esetben a számunkra érdekes szekvencia a DNS-nél jóval érzékenyebb RNS-ben található, nagy gondot kell fordítani az RNS tisztítás hatékonyságára, annál is inkább, mert sokszor ez a lépés dönti el az egész folyamat sikerességét. A jó minőségű RNS kinyerésén túl a folyamat célja az, hogy az RNS-bontó enzimeket és egyéb, az RNS stabilitását csökkentő anyagokat kiküszöböljük mind a mintánkból, mind pedig a reakcióelegy egyéb összetevőiből. E célból gyakran alkalmaznak ribonukleáz inhibitorokat, mint például a dietil-pirokarbonát (DEPC).

Az RNS izolálásnak számos módja ismert. Az egyik legelterjedtebb a guanidiniotiocianát használatán alapul, melyet Chomczynski és Sacchi 1987-ben írtak le, s mely módszer jó minőségű RNS-t eredményez akár szövetkultúrák, akár szervminták sejtjeiből is. Az eljáráshoz szükséges sejtszám igen kevés, akár 1000 is lehet, ami nagyon előnyös a módszer

olyan diagnosztikai célú felhasználásához, ahol eleve csekély a rendelkezésre álló kiindulási sejtszám.

Az ún. oligo(dT) szelekciós módszer, amely a poli-A-val rendelkező mRNS szelektív izolálására alkalmas, főként klónozási célú RNS-tisztításhoz ajánlott. Ez a technika egyébként főleg a génkifejeződés tanulmányozásához jelent értékes segítséget, ahol nagyon fontos a kontamináló genomi DNS kiküszöbölése a vizsgálatokhoz. Számos RNS vírus esetében, mint például a pestivírusok, melyek nem tartalmazzak poli-A véget, ez az egyébként nagyon szelektív eljárás nem jöhet szóba (Liedtke et al., 1994).

3.2. A REVERZ TRANZKRIPTÁZOK

A cDNS szintéziséhez több reverz transzkriptáz is felhasználható. A legáltalánosabban alkalmazottak a Moloney Murine Leukemia Virus reverz transzkriptáz (MMLV RT), melynek ribonukleáz H⁻ mutánsai is hozzáférhetőek, az Avian Myeloblastosis Virus reverz transzkriptáz (AMV RT), és a *Thermus thermophilus*-ból izolált hőstabil *Tth* DNS polimeráz. A *Tth* polimeráz Mn⁺⁺-ionok jelenlétében reverz transzkriptázként működik, alkalmazásával ezért lehetőség nyílt az egy lépéses RT-PCR-re, ami azt jelenti, hogy ugyanabban a csőben zajlik le a reverz transzkripció és a PCR egymás után (Miller és Storts, 1995).

A reverz transzkriptázok, különösen az MMLV RT, rendelkeznek egy - az alkalmazástól függően - gyakran hátrányos tulajdonsággal is, mellyel feltétlenül számolni kell az RT-PCR során. A reverz transzkripció befejezése után ugyanis a megmaradó reverz transzkriptáz aktivitás néhány nukleotidot ad a primerek 3' végéhez, ezáltal kétféleképpen is akadályozva a rákövetkező PCR-t: az egyik az, hogy a primerek éppen azon a végükön módosulnak, ami a PCR szempontjából a kritikusabb, másrészt olyan esetben, amikor nagyjából komplementer fragmentek kerülnek a primerek végeire, a korábbiakban már tárgyalt primer-dimerek keletkezhetnek a specifikus PCR termékek helyett. Éppen ezért, a transzkriptázt inaktiválni kell a

PCR előtt akár hővel, akár fenollal, vagy az egy lépéses RT-PCR-nél a Mn^{++} -k EGTA-val (etilén-glikol-tetraecetsav) való kelátképzésével (Chumakov, 1994).

3.3. PRIMER VÁLASZTÁS A cDNS SZINTÉZISÉHEZ

A cDNS szintéziséhez is kellene primerek, melyek kiválasztásának stratégiája az RT-PCR felhasználási céljától függ. A primerek specificitása nagy befolyást gyakorol ugyanis mind a cDNS mennyiségére mind annak minőségére. Három különböző megoldás közül választhatunk:

1. A legkevésbé specifikus közelítés az, amikor ún. **random hexamereket (hexanukleotidokat)** használunk primerként a cDNS szintéziséhez. Azokban az esetekben indokolt a használatuk, amikor az adott mRNS-t az abban fellelhető és aránylag stabil másodlagos szerkezetek miatt nehéz teljes hosszúságában cDNS-sé átírni. Értelemszerűen minden, a reakcióelegyben található RNS molekula templátként szolgál a hexamerek számára, az RT-PCR specificitását így kizárólag a PCR biztosítja. A random hexamerek felhasználásával szintetizált cDNS-ek 96%-a a riboszomális RNS-ekből származik. Ahhoz, hogy a reakció maximális cDNS hozamát elérjük, a hexamer:RNS arányt empirikusan kell beállítani.

2. A következő módszer az ún. **oligo(dT)** primereket használja, melyek a legtöbb eukariota mRNS 3'-végén található poli-A farkkal komplementerek. Minthogy a **poli-A RNS-ek az összes RNS-nek csak mintegy 1-2 %-át teszik ki**, a keletkező cDNS-ek variabilitása, komplexitása lényegesen kisebb, mint a hexamerek közvetítésével szintetizált cDNS-ek esetében. Nagyfokú specificitása miatt az oligo(dT) primerrel indított reverz transzkripciót általában nem szükséges optimalizálni.

3. A három módszer közül a legspecifikusabb az, amikor a **cél-RNS-hez komplementer oligonukleotidokat** használunk a cDNS-szintézis primereként. A leggyakrabban a PCR primerek közül használják a reverz, általában az mRNS 3' vége felé eső primert. Az eljárás előnye, hogy **már a cDNS is meglehetősen specifikus lesz**, hiszen csak azokat a szegmenteket reprezentálja, amelyek tartalmazzák a PCR-ben célzott szekvenciát. Újabb megfigyelések szerint azonban

gyakran találkozhatunk nem-specifikus termékek felhalmozódásával, ha az előbb említett stratégiát követjük. Ennek elkerülésére ajánlatos egy a reverz PCR primertől legfeljebb 100 nukleotid távolságra tervezett, és természetesen a felerősítendő szakaszon kívülre eső, viszonylag rövid, 12-15 nukleotid hosszúságú **reverz transzkripció primer alkalmazása** a cDNS szintéziséhez. Ily módon nagy mértékben javítható a rákövetkező PCR specificitása, s mivel a rövid primerek T_m -je sokkal alacsonyabb, mint egy átlagos hosszúságú primeré, nem kell azzal számolnunk, hogy a sokszorosítási reakciót megzavarja a jelenléte (Pfeffer et al., 1995; Rashtchian, 1994; Nuovo, 1995; Kawasaki, 1990).

Végül de nem utolsó sorban meg kell említenünk, hogy létezik ma már "alternatívája" is az RT-PCR-nek, mégpedig a nemrégiben kidolgozott NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) technika, mely a PCR-től eltérően nem igényli a reakció-hőmérséklet ciklikus változtatását, hanem három enzim (reverz transzkriptáz, ribonukleáz H és RNS-polimeráz) közreműködésével sokszorozza meg a kimutatandó vírusnukleinsav egy szakaszát állandó hőmérsékleten (Carrino és Lee, 1995).

4. A KÓROKOZÓK KIMUTATÁSÁT SZOLGÁLÓ PCR SAJÁTOSSÁGAI

4.1. ÉRZÉKENYSÉG ÉS SPECIFICITÁS

A PCR, mint biokémiai folyamat érzékenysége alapvetően attól a primerek biztosította specificitástól függ, mellyel képes az adott reakció szempontjából nem specifikus nukleinsav szálak közül a specifikus szakasz megsokszorozására. A képződő reakciótermék mennyiségére, vagyis a reakció teljesítőképességére ugyanakkor jelentős hatást gyakorolnak a reakcióelegy összetevőinek (primerek, enzim, Mg^{++}) koncentrációváltozásai csakúgy, mint az egyes ciklusok paraméterei (a hőmérsékleti értékek ill. az adott lépések időtartama).

Mivel a különböző kórokozók kimutatására legtöbbször a gazdaszervezet nukleinsavának nagy tömegű jelenlétében kerül sor, nagyon fontos, hogy a kórokozóra szigorúan specifikus legyen a PCR, lehetővé téve az adott organizmus valamely szekvenciájának érzékeny és kizárólagos megsokszorozását.

E cél eléréséhez nagy segítséget jelent a gazdaszervezet genomjának, annak nukleotid-sorrendjének minél részletesebb ismerete, ennek hiányában azonban a legtöbb PCR tapasztalati úton nyert eredményekre támaszkodik még ma is. A legjobban optimalizált rendszerekben (mint például a HIV) ugyanakkor lehetőség nyílik akár 1 millió sejt DNS-tartalmának megfelelő nukleinsav mennyiségből kimutatni az 1-10 kópiában jelenlévő vírusgenom specifikus szakaszait. Tisztában kell lennünk azonban azzal, hogy a kimutatási küszöbértéket az 1 kópiához közelítve az eredmény megismételhetősége egyre kérdésesebb lesz, hisz egyre kisebb eséllyel kerül a kevés kópiából valamelyik a PCR-hez adott mintánkba, és számolni kell magának a reakciónak is a sztochasztikus tényezőivel.

A diagnosztikai vizsgálómódszerek felhasználhatóságát azok klinikai érzékenysége és specificitása határozza meg (Gelehrter és Collins, 1990). Különösen fontos állatorvosi

szempontból a PCR járványtani vonatkozású értékelése. Ebből a szempontból a PCR érzékenysége a technika azt a képességét jelenti, mellyel képes minden fertőzött állat kimutatására, a specificitás pedig azt a képességet jelenti, amellyel a PCR megbízhatóan azonosítja a negatív egyedeket. A PCR említett tulajdonságainak értékeléséhez mindig igénybe kell venni a hagyományos diagnosztikai módszerekkel kapott, elsősorban a kórokozók izolálását célzó vizsgálatok eredményeit, melyek magukban foglalnak szerológiai, szövettani és elektron mikroszkópos vizsgálatokat is (Lauerman et al., 1993).

4.2. A KÓROKOZÓK HETEROGENITÁSA

Közismert, hogy számos kórokozó, különösen az RNS vírusok ill. az RNS intermedier közbeiktatásával szaporodó retrovírusok genomja gyakran tartalmaz(-hat) bázis-eltéréseket, inszerciákat, megkettőződéseket ill. deléciókat (Grieser-Wilke et al., 1993; Sugden, 1993). Mai felfogás szerint ezek a vírusok a replikációjukat végző enzim alacsony fokú hűségének, ill. az új vírus-nukleinsav molekula szintézise során fellépő templát váltásnak köszönhetik variációjukat (Meyers et al., 1991). Az RNS polimeráz II-n túl a retrovírusok esetében a reverz transzkriptáz működése közben bekövetkező hibák is hozzájárulhatnak a fenti folyamathoz.

Az újabb fertőzési ciklusok szintén növelik a vírusok variabilitását, ugyanis a gazdaszervezet immunrendszere által szelektív nyomásnak vannak kitéve. Ez a variabilitás diagnosztikai problémákat is okozhat, hiszen kialakulhatnak olyan vírus-variánsok, amelyeknek éppen a PCR által megcélzott régiója szenved valamilyen mutációt, ami lehetetlenné teszi az adott szakasz megsokszorozását. Éppen ezért mindegyik diagnosztikai célra használt primernek és próbának időről időre ellenőrizni kell a specificitását és

érzékenységét, és ha szükséges, új, akár degenerált(abb) oligonukleotidokat kell tervezni és szintetizálni a korábbiak helyett.

4.3. A DIAGNOSZTIKAI PCR TERVEZÉSE

A diagnosztikus PCR tervezése során számos szempontot kell figyelembe venni. Ezek közül az elsők között áll annak mérlegelése, hogy a technika bevezetése indokolt-e egy adott kórokozó kimutatására, szembeállítva az egyéb vizsgálómódszerek költségeivel. Bizonyos esetekben persze a költség tényező háttérbe szorul, mint például a HIV-t kimutató, vagy állatorvosi szempontból a bejelentési kötelezettség alá tartozó fertőző betegségek egynémelyike, ahol lényegesen javítja a diagnosztikai munka hatékonyságát a PCR bevezetése.

Indokolt a PCR használata olyan kórokozók kimutatására is, amelyeket nehéz, vagy rendkívül hosszú ideig tart izolálni, vagy a hagyományos diagnosztikai módszerek kevésbé érzékenyek ill. specifikusak. Ugyanakkor nagy segítséget jelent a PCR a könnyen izolálható kórokozók gyors azonosításában, mivel a megsokszorozott szakaszt további vizsgálatoknak lehet alávetni.

Ha eldöntöttük, hogy az adott kórokozóra használni kívánjuk a PCR-t, a téma szakirodalmát kell alaposan áttanulmányozni. Napjainkra szinte az összes emberi és állati patogénre dolgoztak vagy éppen dolgoznak ki PCR-t, ami nagyban segíti az új felhasználót abban, hogy a nemkívánatos buktatókat lehetőség szerint csökkentse vagy elkerülje a protokoll összeállításánál.

Az adott kórokozó természetétől függően eltérő specificitású PCR(ok) tervezhetők. Ha szigorúan egy faj egy szerotípusát, vagy akár egy genotípusát akarjuk kimutatni, azt megvalósíthatjuk a kórokozó genomjának variábilis régiójára tervezett (szero- vagy genotípus)

specifikus PCR-ben. Minél konzervatívabb régióra tervezzük azonban a PCR-t, annál általánosabb, rendszertanilag magasabb kategóriájú azonosításra nyílik lehetőség. Ez olyankor hasznos, amikor a diagnózis felállításához már elegendő, vagy ahhoz nagyban hozzájárul, ha meghatározható az adott kórokozó rendszertani hovatartozása, s a pontos beazonosítás fajspecifikus PCR-rel, RFLP-vel, Southern-blottolással, SSCP-vel, vagy a nukleotid-sorrend meghatározásával elvégezhető.

Mindkét megközelítéshez szükség van az adott kórokozó(k) szekvenciájának legalább részleges ismeretére, melyhez legkönnyebben a GenBank adatbázisában férhetünk hozzá, az irodalomban közölt szekvenciák mellett természetesen. A GenBank-ból származó adatok azért felelnek meg jobban a célnak, mert számítógéppel közvetlenül feldolgozhatók, ami a primertervezés folyamatát gyorsítja ill. könnyíti meg számottevően.

Miután kiválasztottuk a diagnosztikai szempontból legmegfelelőbb genomszakaszt, elvégezzük a potenciális primerek analízisét a primerek kiválasztásánál leírtak szerint (kinetikai paraméterek, GC arány, stb.). Ezután ismét a GenBank-hoz folyamodva le kell ellenőrizni a kiválasztott, s az eddigiekben megfelelőnek talált fragment specificitását, vagyis azt, hogy az eddig rendelkezésre álló szekvencia adatok szerint primerjeink csak az általunk kívánt szekvenciát/szakaszt sokszorozzák meg. Ez a lépés feltétlenül szükséges a későbbi, téves pozitív reakciók elkerüléséhez, ami kevésbé szigorú reakció körülmények között még abban az esetben is bekövetkezhet, ha csak az egyik primer specificitása nem megfelelő (Hiltunen et al., 1994).

Az ellenőrzés kedvező eredménye esetén a szintetikus úton előállított primereket először tisztított cél-nukleinsavon célszerű kipróbálni, melyen meghatározható a rendszer érzékenysége, valamint beállítható az optimális Mg^{++} koncentráció. Ezek elvégzése után lehet klinikai mintákon tesztelni a PCR-t, melyek során a megfelelő tisztítási eljárás kidolgozása

alapvető fontosságú (megbízhatóság, ismételhetőség, egyszerűség, költség). Az RNS vírusok kimutatásához szükséges reverz transzkripció elvégzésére számos lehetőség nyílik: a vizsgáló maga összeállíthatja az RT elegyet, de vannak előre összeállított, néha speciális célokat szolgáló ún. RT-kitek, melyek között már olyan is van (lásd előbb), mely az RT-hez és a PCR-hez is ugyanazt az egy enzimet használja.

Bármilyen lépésekből is állítják össze a módszereket, azoknak standardizálhatónak kell lenni. Ez azt jelenti, hogy a bevált eljárás lépéseit kell mindig szigorúan követni annak érdekében, hogy minimálisra csökkentsék a térben és/vagy időben egymástól elválasztva, de ugyanazt a leírást követő reakciók feltételei közötti különbséget.

Végül érdemes ismételten hangsúlyozni, hogy a rendszer érzékenységét, specificitását rendre ellenőrizni kell, ugyanakkor követni kell a vonatkozó irodalmat is, hogy az esetlegesen felbukkanó új variánsokra időben és hatékonyan reagálni tudjunk PCR-rendszerünk célszerű módosításával, megőrizve így annak diagnosztikai értékét.

5. KÍSÉRLETEK

5.1. Homológ DNS szekvenciák kimutatása állati adenovírusokból polimeráz láncreakció felhasználásával

Megjelent: I. Kiss, Katalin Matiz, Annika Allard, G. Wadell és Mária Benkő (1996): Acta Veterinaria Hungarica 44, 243-251

BEVEZETÉS

A szarvasmarha (BAV) (Kurokawa et al., 1978; Belák et al., 1983; Hu et al., 1984b; Benkő et al., 1988), sertés (PAV) (Garwes és Xuan, 1989; Benkő, 1990; Kleiboeker et al., 1993; Reddy et al., 1993, 1995; Tuboly et al., 1995), és juh (OAV) (Benkő, 1990; Boyle et al., 1994) adenovírusok különböző szerotípusai DNS-ének restrikciós enzimes (RE) vizsgálata azt mutatta, hogy sem az említett állati adenovírusok között, sem közöttük és bármely humán adenovírus (HAV) között nincs szoros genetikai rokonság. Egyetlen kivétel a BAV-9, melynek RE mintázata nagyon hasonló a C csoportba tartozó HAV-okéhoz (Benkő, 1990). A HAV-ok, BAV-ok és PAV-ok Southern hibridizációban történt vizsgálata viszont hasonlóságot mutatott ki a 3 csoport között, mely alól kivételt képeznek azonban a 2-es alcsoportba tartozó BAV-ok (a szerológiai és biológiai tulajdonságaikban eltérő vírusok csoportja, Bartha, 1969). Ezek ugyanis sem a HAV-okkal sem az 1-es alcsoportbeli BAV-okkal nem mutattak homológiát (Benkő 1990; Benkő és Harrach, 1990), sőt, a BAV-7 például inkább az egg drop syndrome (EDS) vírussal - valamint a 287-es jelzésű juh adenovírussal - mutat szorosabb filogenetikai rokonságot (Harrach et al., 1997; Harrach és Benkő, in press). A szarvasmarha adenovírusokról eddig rendelkezésre álló szekvencia adatok azt mutatják, hogy a genomszerveződés, a legfontosabb gének (főként a késői mRNS-k génjei) mérete és elhelyezkedése a genomban nagyon hasonló a más állati és a humán adenovírusokban

találtakhoz (Hu et al., 1984a; Mittal et al., 1992; Elgadi et al., 1993; Esford és Haj-Ahmad, 1994; Salmon és Haj-Ahmad, 1994).

A HAV-ok általános kimutatására már korábban kidolgoztak egy PCR-t (Allard et al., 1990). A reakcióban használt primerek (HexAA1885 és HexAA1913) a hexon fehérje P1 doménjének β -barrel formáló szakaszát kódoló szekvencia egy 301 bp hosszúságú darabját fogják közre (Roberts et al., 1986). Ez a szakasz a régió legkonzervatívabb darabja, nukleotid-sorrendje megegyezik az összes ismert HAV-ban. Ezzel a PCR-rel sikeresen mutatták ki a mind a 6 szubgenust (A-F) reprezentáló 18 HAV szerotípust (Allard et al., 1990). A szarvasmarha adenovírusokból rendelkezésre álló szekvencia adatok ismeretében a primereket kissé módosítottuk, s megvizsgáltuk azok felhasználhatóságát az állati adenovírusok kimutatására.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A felhasznált vírusok. A kísérletekben felhasznált vírusok megnevezése és felsorolása az 1. táblázatban látható. A BAV-ok prototípus törzseit Benkő (1990), a PAV-okét Derbyshire (1989), az OAV-két Belák (1990) tekintette át a közelmúltban. A BAV-10 prototípus törzse mellett annak 4, Észak-Írországból származó izolátumát (Adair et al., 1996) is megvizsgáltuk.

1. táblázat. A vizsgált vírustörzsek jelölése és referenciái.

Szerotípus	Alcsoport	Izolátum	Referencia	Év
BAV-1	1	B-10	Benkő et al.	1988
BAV-2	1	B-19	Benkő et al.	1988
BAV-3	1	WBR-1	Benkő et al.	1988
BAV-4	2	THT/62	Benkő et al.	1988
BAV-5	2	B4/65	Benkő et al.	1988
BAV-6	2	671130	Benkő et al.	1988
BAV-7	2	Fukuroi	Benkő et al.	1988
BAV-8	2	285	Benkő et al.	1988
BAV-9	1	Sofia-4/67	Benkő et al.	1988
BAV-10	1	Ruakura	Horner et al.	1989
BAV-10	1	Belfast 1	Adair et al.	1996
BAV-10	1	Belfast 2	Adair et al.	1996
BAV-10	1	Belfast 3	Adair et al.	1996
BAV-10	1	Belfast 4	Adair et al.	1996
OAV-1		S1	Belák	1990
OAV-2		PX515	Belák	1990
OAV-3		PX611	Belák	1990
OAV-4		7769	Belák	1990
OAV-5		SAV	Belák	1990
OAV-6		WV419	Belák	1990
PAV-1		25R	Derbyshire	1989
PAV-3		6618	Derbyshire	1989
PAV-5		HNF70	Hirahara et al.	1990

A vírus-DNS előkészítése. A kísérletekhez fenollal kivont és alkohollal kicsapott vírus DNS-ek 6-10 µg/ml koncentrációjú oldatát (agaróz gélen megbecsülve) ill. a vírusokkal fertőzött szövettenyészetek durva lizátumát használtuk. A DNS kivonási eljárást már korábban ismertettük (Benkő et al., 1988), és a következők szerint végeztük: a sejtkárosító hatás teljessé válása után a vírusokat többszöri fagyasztással felolvasztással (-20°C-ról

szobahőmérsékletre) szabadítottuk ki sejtekből. A sejtörmeléktől alacsony fordulatszámú centrifugálással szabadultunk meg. A vírustartalmú felülúszót ultracentrifugán centrifugáltuk (24 ezer/perc fordulatszámmal 1,5 óráig). Az üledéket az eredeti térfogat 1/100-1/500 részének megfelelő TE pufferben reszuszpendáltuk, ultrahanggal homogenizáltuk, majd ultracentrifugában (az előző paraméterekkel) 0,3 tömegrészes szacharóz oldat alá üleptítettük. Az így nyert üledéket 2 ml TE pufferben vettük fel. Proteinase K-val történt emésztés után agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük a vírus DNS tisztaságát (egységes, háttér nélküli DNS csík). A vírus-szuszpenziót ezután 2 ml térfogatban, 5 mg/ml SDS és 50 µg/ml Proteinase K jelenlétében 37°C-on 4-16 órán át inkubáltuk. Ezután azonos térfogatú (TE pufferrel telített) fenollal elegyítettük, majd a rétegeket 5 percig tartó, 3000 fordulat/perc sebességű centrifugálással szétválasztottuk. A felső (DNS-tartalmú) vizes fázist új csőbe tettük, és a fenolos kivonást kétszer megismételtük. A harmadik centrifugálás után a vizes fázist kloroform:izoamil-alkohol 24:1 arányú keverékével ráztuk ki a teljes fehérjementesítés és a fenolmaradék eltávolítása céljából. A vizes fázist újabb csőbe tettük és 0,1 rész 3 M-os (pH 5,2) Na-acetát oldatot adtunk hozzá. Ezután a vírus-DNS-t 2,5-szeres térfogatnyi (rendszerint 5 ml) -20°C-os abszolút alkohol hozzáadásával kicsaptuk. 70%-os alkohollal való mosás és szárítás után, a csapadék mennyiségétől függően 50-300 µl TE pufferrel oldottuk fel. A nyert DNS-oldatok koncentrációját 1 µl DNS-oldat minigélen történt elektroforetikus futtatásával határoztuk meg. A DNS-preparátumokat 5 µl/ml kloroform hozzáadása után akár évekig is tárolni lehet +4°C-on, károsodás nélkül.

A vírussal kémcsövekben fertőzött szövetekkel a következőképpen jártunk el: a maximális citopatogén hatás kialakulásakor a csöveket kétszer lefagyasztottuk -20°C-ra és felolvasztottuk szobahőmérsékletre, majd minden csőből 0,5 ml-nyi, sejtörmeléket tartalmazó tápfolyadékot 10 percig forraltunk. Ezután az oldatot 5 percig centrifugáltuk

mikrocentrifugában, maximális fordulatszámmon. A felülúszó 1 µl-ét használtuk a PCR-hez. Negatív kontrollként fertőzetlen MDBK sejtek szolgáltak, melyeket szintén a leírt módon kezeltünk. A PAV-5 DNS-ét dr. Tuboly Tamás bocsátotta a rendelkezésünkre.

Primerek. A HAV-ok kimutatására tervezett, 25 nukleotid hosszúságú, HexAA1885 jelölésű „bal”, és a 23 nukleotidból álló, HexAA1913 jelölésű „jobb” primerek szekvenciáját a 2. táblázat tartalmazza. A BAV-3 hexongénje szekvenciájának ismeretében (Hu et al., 1984a), valamint a BAV-4 AT gazdag kódolási stratégiája alapján (Benkő és Harrach, 1994) módosítottuk a primerek szekvenciáját úgy, hogy a bal primer 7. és 13., valamint a jobb primer 5., 6., 7., és 22. nukleotidjának a 2. táblázatban részletezett mértékű degenerációt engedélyeztünk a szintézisük során. A bal primer esetében így négyszeres, a jobb primer esetében pedig tizenhatszoros degenerációt értünk el, ugyanakkor a kódolt aminosavak változatlanok maradtak egy kivétellel, a jobb primer 5' végén, ahol egyébként a BAV-3 és a HAV-ok is különböző aminosavakat tartalmaznak (Toogood et al., 1988). A primereket Gene Assembler Special automatán (Pharmacia LKB) szintetizáltuk.

2. táblázat. A PCR primerek szekvenciája

Primer	Szekvencia	Amplikon hossza (bp)
HexAA1885	5' GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC 3'	301
HexAdB	5' GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC 3' A C	301
HexAA1913	5' CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT 3'	301
HexAdJ	5' CAGC <u>ACG</u> CCGCGGATGTCAAAGT 3' GTA A	301

A HexAA1885 és HexAA1913 primerek az eredetileg a humán adenovírusok kimutatására tervezett oligonukleotidok, a HexAdB és HexAdJ pedig az általunk módosított (B=bal ill. J=jobb) primerek. Az aláhúzott betűk jelölik azokat a nukleotidokat, ahol a degeneráltságot előidéztük, az alternatívan beépülő nukleotidokat pedig a primer szekvenciák alatt tüntettük fel.

Polimeráz láncreakció. A PCR-t 50 µl reakcióelegyben végeztük, mely 5 µl-t tartalmazott a következő összetételű, 10-szeres koncentrációjú pufferből: 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, és 100 mM Tris-HCl, pH 9,0, valamint 50 pmol mindkét primerből, 1 U *Taq* polimerázt, 300 µM-t mindegyik dNTP-ből (dATP, dCTP, dGTP, és dTTP; Pharmacia LKB), és 1-5 µl-t a vírus DNS oldatából. A reakcióelegyet desztillált vízzel egészítettük ki 50 µl-re. Pozitív külső kontrollként HAV-2 genomi DNS-t használtunk, negatív kontrollként pedig fertőzetlen MDBK sejtek lizátuma szolgált.

A DNS sokszorozást két automatában végeztük: az egyik egy DNA Thermal Cycler, (Perkin Elmer Cetus), amellyel a Debreceni Állategészségügyi Intézetben, a másik egy PDR 91 DNA reproducer (BLS Ltd., Hungary) gép volt, mellyel az MTA Állatorvostudományi Kutatóintézetében hajtottuk végre a reakciókat, a következő lépések szerint:

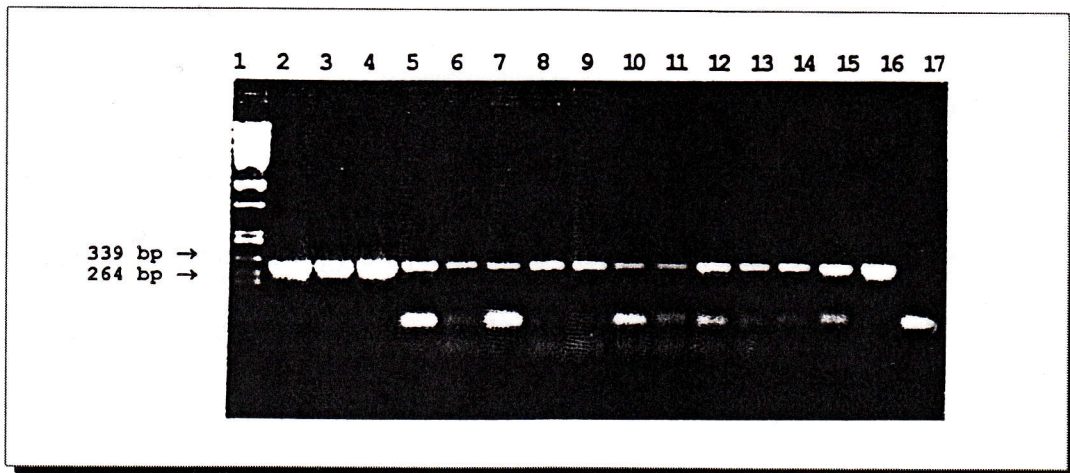
Ciklus száma	Denaturáció	Annealing	Polimerizáció
1.	94°C 10 perc	55°C 30 mp	72°C 30 mp
2-34.	94°C 30 mp	55°C 30 mp	72°C 30 mp
35.	94°C 30 mp	55°C 30 mp	72°C 5 perc

A 2. alcsoportba tartozó BAV-ok vizsgálatai során alacsonyabb, 45°C-os annealing hőmérsékletet is teszteltünk.

A PCR termékek kimutatása. A reakció befejezésekor 8 µl mintát futtattunk 1,5%-os agaróz gélen (SeaKem), 0.5 µg/ml etidium-bromidot tartalmazó TBE pufferben, 110 V feszültséggel 45 percig. Molekulatömeg standardként *Pst* I restrikciós enzimmal emésztett λ fág DNS-t használtunk (Fermentas, Lithuania). A géleket ezután 302 nm-es UV fényvel megvilágítva értékeltük, ill. fényképeztük, Polaroid 665 és/vagy 667 filmeket használva.

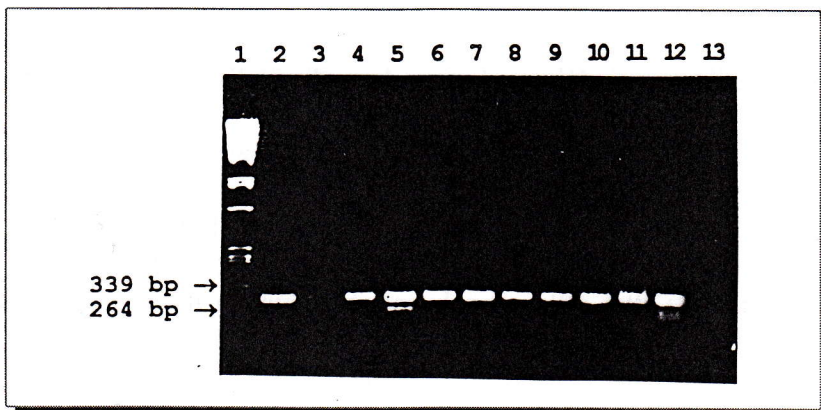
EREDMÉNYEK

Az 55°C-os annealing hőmérséklet alkalmazásával elvégzett PCR-ek termékeit tartalmazó agaróz géleket az 1. és a 2. ábra tartalmazza. Ahogy az jól látható, a várt kb. 300 bp-os DNS fragmentet sikerült megsokszorozni az összes vizsgált adenovírusból. A csíkok eltérő intenzitása arra utal azonban, hogy a megsokszorozott szakaszok mennyisége különbözik vírusonként. Ez legkifejezettebben a 2. alcsoportba tartozó BAV-ok esetében figyelhető meg, ahol általában jóval kisebb a keletkezett termékek mennyisége (1. ábra). Hasonlóan gyengébb intenzitású csíkok figyelhetők meg a durva sejtlyázatok PCR-je után is (2. ábra, 2. és 3. oszlopok).



1. ábra. A különböző szarvasmarha adenovírusok HexAdB és HexAdJ primerek felhasználásával sokszorosított PCR-termékeinek gélelektroforézis képe. A számokkal jelölt oszlopokban a következő minták PCR termékeit futtattuk:

1: Molekulatömeg standard: λ fág DNS *Pst*I-gyel emésztve; 2: BAV-1 DNS; 3: BAV-2 DNS; 4: BAV-3 DNS; 5: BAV-9-cel fertőzött szövettenyészet lizátuma; 6: BAV-4-gyel fertőzött szövettenyészet lizátuma; 7: BAV-5-tel fertőzött szövettenyészet lizátuma; 8: BAV-6 DNS; 9: BAV-7 DNS; 10: BAV-8 DNS; 11: a BAV-10 prototípus törzsével (Ruakura törzs) fertőzött szövettenyészet lizátuma; 12-15: a BAV-10 különböző izolátumainak DNS-e, a következő sorrendben: Belfast-3, Belfast-2, Belfast-4, és Belfast-1; 16: Pozitív kontroll: HAV-5 DNS; 17: Negatív kontroll: fertőzetlen MDBK sejtek lizátuma.



2. ábra. A sertés- és juh adenovírusok PCR termékeinek gélelektroforézis képe. 1: Molekulatömeg standard: λ fág DNS *Pst*I-gyel emésztve; 2: OAV-6 DNS; 3: OAV-6-tal fertőzött szövettenyészet lizátuma; 4: OAV-5-tel fertőzött szövettenyészet lizátuma; 5: OAV-1 DNS; 6: OAV-2 DNS; 7: OAV-3-mal fertőzött szövettenyészet lizátuma; 8: OAV-4-gyel fertőzött szövettenyészet lizátuma; 9: PAV-5-tel fertőzött szövettenyészet lizátuma; 10: PAV-1 DNS; 11: PAV-3 DNS, 12: Pozitív kontroll: HAV-5 DNS; 13: Negatív kontroll: fertőzetlen MDBK sejtek lizátuma.

MEGBESZÉLÉS

A különböző mikroorganizmusok kimutatására modern molekuláris biológiai technikákat alkalmaznak napjainkban, mint a DNS hibridizáció, restrikciós fragment hossz polimorfizmus vizsgálatok, vagy a DNS *in vitro* megsokszorozása PCR-el. Kísérleteinkben a PCR alkalmazhatóságát vizsgáltuk meg különféle szarvasmarha, juh és sertés adenovírusok kimutathatóságára. Ezek közül néhányat már vizsgáltak korábbi szerzők, egy eredetileg a humán adenovírusok kimutatására tervezett primer pár segítségével (Allard, 1990; Benkő 1990), és a módszert alkalmasnak találták bizonyos állati adenovírusok megfelelő genomszakaszának megsokszorozására is. Eredményeiket Southern hibridizációval erősítették meg (Benkő, 1990). Azonban már az említett szerzők is megfigyelték, hogy a 2-es alcsoportba tartozó BAV-ok esetében a sokszorozás hatékonysága alacsonyabb, mint amit a többi állati adenovírusnál tapasztaltak. A PCR termékek mennyiségét ezekben az esetekben némileg növelni tudták a primerek hibridizációs hőmérsékletének 45°C-ra csökkentésével (Benkő, 1990).

A hozzáférhetővé vált állati adenovírus-szekvenciák ismeretében (Hu et al., 1984a; Benkő és Harrach, 1994) szükség volt a humán adenovírusokra tervezett primerek módosítására abból a célból, hogy felhasználhatók legyenek az állati adenovírusok kimutatására is. A módosított (tulajdonképpen degenerálttá tett) primerek alkalmazásával a pozitív standardként használt HAV-2-ből szintetizált, kb. 300 bp hosszúságú szakaszt sikerült nyerni a PCR során a különböző sertés, juh, és az 1-es alcsoportba tartozó szarvasmarha adenovírusokból is. A 2-es alcsoportba tartozó BAV-ok esetében még mindig kisebb mennyiségű reakcióterméket észleltünk a gélelektroforézis során (1. ábra), de ez már több volt, mint az eredeti primerekkel észlelt mennyiségek (Benkő, 1990).

Kísérleteink további bizonyítékát szolgáltatták a különféle állati adenovírusok hexongénjében található erősen konzervatív szakaszok meglétének. Ez a megfigyelés jól felhasználható a fizikális térképek készítésénél a klónok irányultságának meghatározásánál, mivel egy adott fragment gyorsan tesztelhető PCR-el a konzervatív hexondarab jelenlétére. Sőt, a leírt PCR protokoll alkalmas lehet filogenetikai tanulmányok végzésére is, a megsokszorozott szakasz rövidege ellenére, mivel a számítógépes programok lehetővé teszik akár rövidebb aminosav vagy nukleotid szekvencia esetén is az összehasonlítás elvégzését, ha az említett szakaszok ugyanarról a genomi régióról származnak (Bailey és Mautner, 1994). Ugyanakkor az is igaz, hogy a pontosabb vizsgálatok elvégzéséhez nagyobb nukleinsavszakaszra, következésképpen más primerekre lenne szükség.

Módszerünk gyakorlati haszna az, hogy alkalmazásával lehetőség nyílik a nehezen izolálható, tenyésztethető adenovírusok kimutatására. A technikával észlelhető vírusok felölelik az összes ma ismert szarvasmarha adenovírust, beleértve a nemrégiben leírt, s önálló kórképet okozó és valószínűleg új alcsoportba tarozó BAV-10-et is (Benkő et al., 1995; Matiz, 1997; Matiz et al., submitted), valamint juh, ill. sertés adenovírus törzseket is, s a legfrissebb adatok szerint macskából is sikerült a leírt primerekkel adenovírus specifikus szekvenciákat fölerősíteni (Lakatos et al., 1997). A módszer rutindiagnosztikai bevezetéséhez számos klinikai minta vizsgálata szükséges még, lehetőség szerint minél egyszerűbb, de ugyanakkor megbízható és reprodukálható mintafeltárás alkalmazásával.

El kell ismerni azonban, hogy mind a már említett filogenetikai vizsgálatok elvégzésére, mind pedig egy adott vírus azonosítására nagyobb eséllyel vállalkozhatunk egy hosszabb, 500-1000 bp hosszúságú PCR termékből kiindulva.

5.2. A kutyák fertőző májgyulladás: a kutya 1-es típusú adenovírusának kimutatása polimeráz láncreakcióval

Megjelent: I. Kiss, Katalin Matiz, E. Bajmócy, M. Rusvai és B. Harrach (1996): Acta Veterinaria Hungarica 44, 253-258

BEVEZETÉS

A kutya 1-es típusú adenovirusa (CAV-1), a kutya fertőző májgyulladásának (Rubarth-féle betegség) kórokozója heveny lezajlású, súlyos betegséget idéz elő kutyákban és egyéb húsevőkben. A 2 évesnél idősebb kutyák között csak sporadikusan figyelhető meg elhullás a betegség következtében, a fél évesnél fiatalabb állatok megbetegedése azonban többnyire halállal végződik. A kiterjedten alkalmazott vakcinázásnak köszönhetően a Rubarth-kór ma már csak ritkán észlelhető.

Noha a betegség következtében fellépő klinikai tünetek és kórbonctani elváltozások jellemzőek (Kelly 1993), a specifikus diagnózis felállításához szükség van a vírus (vagy vírusantigének) kimutatására a szövetekben. A CAV-1 általában kutya-, sertés, és nyércveseszövettenyészetekben történő izolálása eléggé nehézkes, gyakran több vakpasszázsra van szükség a vírusra jellemző citopatogén hatás megjelenéséig (Szent-Iványi és Mészáros, 1985).

Kísérleteinkben a PCR-t alkalmaztuk, mint a vírusizolálás alternatív módszerét, lehetővé téve így a diagnózis gyors és specifikus felállítását.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Esetleírás, klinikai tünetek. 1. eset. 1995 tavaszán egy négy hónapos kaukázusi juhász eb hulláját hozták kórbonctani vizsgálatra a Debreceni Állategészségügyi Intézetbe. A kölyök korábban csak a kutya 2-es típusú parvovirusa és szopornyica ellen volt vakcinázva. Az elhullás előtt 2 nappal az állat hányt, magas láza volt, és kifejezett hastájéki fájdalmat jelzett; a harmadik nap reggelén elhullva találták.

Kórbonctani és kórszövettani vizsgálatok. A kórbonctani, és a máj hematoxin-eozinnal festett szövettani metszeteinek mikroszkópos vizsgálatát a Debreceni Állategészségügyi Intézet Emlőskórbonctani Osztályán végeztük. A májból a későbbi PCR vizsgálatokhoz szervmintákat helyeztünk el -20°C -on.

2. eset. Egy hasonló esetet regisztráltak az Országos Állategészségügyi Intézetben, 1992-ben. Az elhullott kutya májából szervmintát juttattak az Állatorvostudományi Egyetem Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékére, ahol MDCK sejtvonalon adenovírust izoláltak abból. A vírusneutralizációs próbában (melyhez a hiperimmun szérumot L. E. Carmichael professzor bocsátotta a rendelkezésre) a vírus CAV-1-nek bizonyult. A szervmintákat továbbra is megőrizték -20°C -on, melyeket a későbbiek során pozitív kontrollként használtunk.

Minta-előkészítés. A vírus DNS feltárását kétféle módszerrel végeztük. Az elsőben (A módszer) lényegében egy standard DNS tisztítást végeztünk el, aminek során először Proteinase K-val emésztettük a PBS-el 1:10 arányban homogenizált szervmintákat, majd fenol/kloroformos kivonást és alkoholos kicsapást végeztünk (Benkő, 1990). A másik, (B) eljárás során a következő, egyszerű tisztítási lépéseket végeztük: kb. egy gramm májszövetet 1:10 arányban homogenizáltunk PBS-ben, majd háromszor lefagyasztottuk és felolvasztottuk (-20°C -ra, ill. szobahőmérsékletre). Ezután 10 percig forraltuk a mintákat. Az ily módon

roncsolt elegyet 1-1 ml-es adagokban Eppendorf csövekbe töltöttük, és maximális fordulatszámon 5 percig centrifugáltuk mikrocentrifugában. A kapott felülúszók 2 μ l-ét használtuk mintaként a PCR-ben.

Kontrollok. HAV-5 tisztított DNS-ét használtuk külső pozitív kontrollként, míg negatív kontrollként fertőzetlen kutyából származó, s a fentiek szerint feltárt májminta szolgált.

Primerek. A kísérletekben használt primerek (HexAdB és HexAdJ) szekvenciáját korábban leírtuk (Kiss et al., 1996a). A primereket Gene Assembler Special (Pharmacia LKB) oligonukleotid szintetizáló berendezésen szintetizáltuk.

Polimeráz láncreakció. A PCR-t 50 μ l reakcióelegyben végeztük, mely 5 μ l-t tartalmazott a következő összetételű, 10-szeres koncentrációjú pufferből: 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, és 100 mM Tris-HCl, pH 9.0, valamint 50 pmol mindkét primerből, 1 U *Taq* polimerázt, 300 μ M-t mindegyik dNTP-ből (dATP, dCTP, dGTP, és dTTP; Pharmacia LKB), és 2 μ l-t a vírus DNS oldatából. A reakcióelegyet desztillált vízzel egészítettük ki 50 μ l-re. A DNS sokszorozást DNA Thermal Cycler, (Perkin Elmer Cetus) automatában végeztük, a következő lépések szerint:

Ciklus száma	Denaturáció	Annealing	Polimerizáció
1.	94°C 10 perc	55°C 30 mp	72°C 30 mp
2-34.	94°C 30 mp	55°C 30 mp	72°C 30 mp
35.	94°C 30 mp	55°C 30 mp	72°C 5 perc

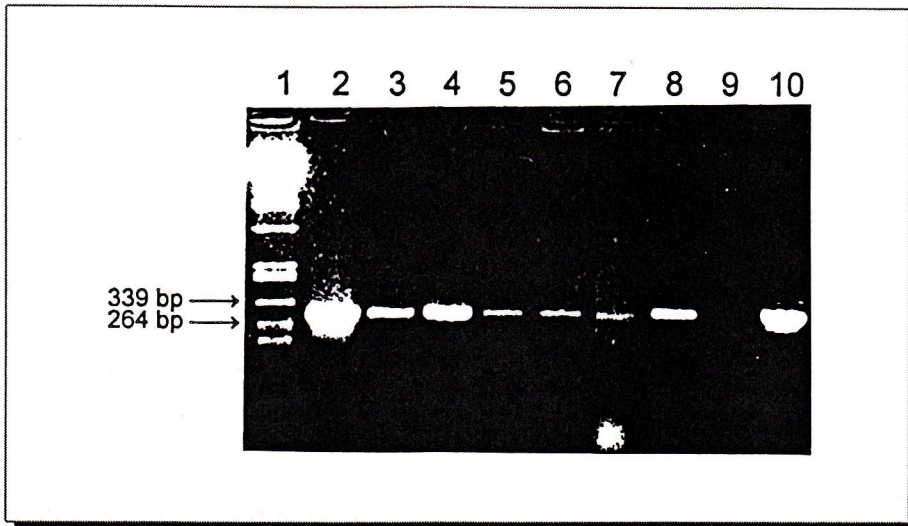
A PCR termékek kimutatása. A reakció befejezésekor 8 μ l mintát futtattunk 1.5%-os agaróz gélen (SeaKem), 0.5 μ g/ml etidium-bromidot tartalmazó TBE pufferben, 110 V feszültséggel 45 percig. Molekulatömeg standardként *Pst* I restrikciós enzimmel emésztett λ fág DNS-t használtunk (Fermentas, Litvánia). A géleket ezután 302 nm-es UV fényrel megvilágítva értékeltük, ill. fényképeztük, Polaroid 665 és/vagy 667 filmeket használva.

EREDMÉNYEK

Kórbonctani és kórszövettani vizsgálatok. A kaukázusi juhászkutya boncolásakor a hasüregben megszorodott vörhenyes folyadékot találtunk, a savóshártyákon enyhe fokú sárgaság és petechiális vérzések voltak megfigyelhetők. A máj megnagyobbodott, merev, törékeny volt. Az epehólyag fala ödémásan megvastagodott. A máj szövettani vizsgálata a májsejtek elfajulását ill. elhalását mutatta, néhol véres beszűrődésekkel. A parenchymasejtek egy részében a CAV-1 jelenlétére utaló nagy, acidofil magzárványokat figyeltünk meg. A 2. esetben vizsgált kutyahullában az elsőhöz hasonló elváltozásokat észleltünk.

PCR. Az 1. ábra a pozitív kontrollok (HAV-5 DNS és a 2. eset mintája) PCR termékeit tartalmazó géleket mutatja. Látható, hogy a CAV-1-ből valamivel kevesebb PCR termék képződött, mint a HAV-5-ből. Ettől eltekintve az is világosan megállapítható, hogy a két PCR termék méretében megfelel egymásnak.

A 2. ábra a szerv-dörzsölékekből elvégzett PCR eredményeit mutatja. Az ebben az esetben alkalmazott egyszerűbb DNS feltárási eljárást (B eljárás) megfelelő hatékonyságúnak találtuk a PCR elvégzéséhez. Ahogy az első ábrán látható (6. és 7. oszlop), csak kis különbség észlelhető a PCR termékeket reprezentáló csíkok intenzitása között, ugyanannak a mintának kétféle eljárással történt feltárása és PCR-e után. Nyilvánvaló, hogy a hagyományos eljárással kivont minta "tisztá" DNS koncentrációja magasabb az egyszerűbb protokolléhoz hasonlítva. Ez a minta azonban nagy mennyiségben tartalmazhat kontamináló genomi DNS-t is, melynek a PCR-t zavaró hatása miatt a tisztább DNS-ből származó előny nem használható ki teljes mértékben a minta megfelelő hígítása nélkül.



1. ábra. Különböző módon előkezelt minták PCR termékeit tartalmazó agaróz gélelektroforézis eredménye. A számokkal jelölt oszlopokban a következő minták PCR termékeit futtattuk:

1: Molekulatömeg standard: λ fág DNS *Pst*I-gyel emésztve; 2 és 10: Pozitív kontroll: HAV-5 DNS; 3-5: Az izolált CAV-1 harmadik passzázsából származó szövettenyészet felülúszó, a B eljárással (lásd a szövegben, 3. oszlop), ill. az A eljárással (lásd a szövegben, 4. és 5. oszlop) feltárva. A 4. oszlop a reakció előtt 100-szorosára hígított minta PCR termékét tartalmazza; 6-8: a 2. esetből származó állat májának homogenizátuma, a B eljárás (6. oszlop), ill. az A eljárás (7-8) szerint feltárva. 8: ugyanaz, mint a 7. oszlop, de a mintát 100-szorosára hígítottuk a PCR-t megelőzően; 9: Negatív kontroll: egészséges kutya májának homogenizátuma, a B eljárással feltárva.



2. ábra. A B eljárással feltárt szövet-homogenizátumokból kapott PCR termékek gélelektroforézisének eredménye, 1,5%-os agaróz gélben.

1: Molekulatömeg standard: λ fág DNS *Pst*I-gyel emésztve; 2: Külső pozitív kontroll: HAV-5 DNS; 3: Specifikus külső pozitív kontroll: a 2. esetből származó, B eljárással feltárt szövet-homogenizátum; 4: az 1. esetből származó, B eljárással feltárt szövet-homogenizátum; 5: Negatív kontroll: egészséges kutya májából származó, B eljárással feltárt szövet-homogenizátum.

MEGBESZÉLÉS

A közelmúltban kidolgozott polimeráz láncreakció (PCR) egy *in vitro* módszer meghatározott DNS-szakaszok enzimátikus felszaporítására, két, a megsokszorozandó szakaszt közrefogó specifikus oligonukleotid primer segítségével (Saiki 1989). A módszer nagy népszerűsége tett szert a biológia számos területén, az alapkutatótól a rutindiagnosztikai felhasználásig. A fejlettebb országokban a PCR mára már szerves része lett a humán medicinának, és térhódítása egyre nő az állatorvosi diagnosztikában is (Belák és Ballagi-Pordány, 1993). A technika természetéből fakadó kockázati tényezők megfelelő kiküszöbölésével a PCR nagy segítséget jelenthet olyan kórokozók gyors és specifikus kimutatásában és azonosításában, melyeket egyébként nehéz vagy hosszadalmas izolálni.

Kísérleteinkben a CAV-1 klinikai mintákból történő kimutatására vizsgáltuk meg a PCR alkalmazhatóságát. A reakciók során felhasznált primereket eredetileg a humán adenovírusok kimutatására tervezték (Allard et al., 1990), majd némileg módosítva azokat különböző szarvasmarha, sertés, és juh adenovírusok hexongén szekvenciáinak fölerősítésére alkalmazták (Kiss, et al., 1996a). Kísérleteink során bebizonyosodott, hogy a módosított primerek sikerrel alkalmazhatók a CAV-1 kimutatására is, akár szövettényezet felülűszóból, akár szervmintákból.

A PCR egyszerűségével és gyorsaságával nyújt előnyöket a hagyományos vírusizolálással szemben (Kiss et al., 1997). A CAV-1 és CAV-2 genomrészeinek szövettényezet felülűszóból történt sikeres fölerősítéséről mindenfajta kémiai előkezelés nélkül már beszámoltak (Harasawa et al., 1994). Szerv-homogenizátumokat vizsgálva mi szintén úgy találtuk, hogy egy egyszerű fizikai feltárás is megfelelő a CAV-1 PCR-el történő kimutatásához. Annál is inkább, mert a vírus DNS-t "kísérő", a gazdaszervezetből származó

genomi DNS túl magas koncentrációja akadályozhatja a PCR-t (2. ábra, G és H oszlop). Hozzá kell tenni ugyanakkor, hogy kísérleteink nem célozták a reakció kvantitatív értékelését.

A kiterjedt vakcinázás miatt a kutya fertőző májgyulladás meglehetősen ritka manapság Magyarországon. Következésképpen kevés az elhullással járó esetek száma is. A kísérletek lefolytatása közben mintákat kaptunk egy a fertőző májgyulladás gyanújával elhullott kutya májából is. Így még az eb-hulla intézetbe szállításának napján negatív PCR eredményt közöltünk a patológusokkal, amelyet a következő napon kiértékelt kórszövetteni vizsgálatok is megerősítettek, jelezvén, hogy a makroszkóposan megállapított májgyulladásnak egyéb, nem adenovírusos eredetű oka volt. Úgy gondoljuk ezért, hogy a leírt PCR protokoll hasznos lehet az adenovírusok jelenlétének, oktani szerepének kizárásában is adott esetben.

5.3. Baromfira patogén mycoplasmák kimutatása és azonosítása polimeráz lánreakcióval és restrikciós fragment hossz polimorfizmus vizsgálattal

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

BEVEZETÉS

A mycoplasmák jelentős gazdasági veszteségeket okoznak a baromfitenyésztésben. A mycoplasma fertőzéseket általában szerológiai vizsgálatokkal diagnosztizálják, melyek során gyakran tapasztalhatók a különböző mycoplasma fajok közötti keresztreakciók ill. nem specifikus reakciók. Sőt, vannak olyan mycoplasmák, mint például a *M. iowae*, mely nagyfokú heterogenitása és az általa kiváltott gyenge immunválasz miatt igen nehéz megbízható szerológiai próbát alkalmazni az általa okozott fertőzések kiderítésére (Jefferey et al., 1995). A szerológiai eredmények megerősítésére ill. igazolására gyakran megkísérlik mycoplasmák kitenyésztését is. Az ún. növekedésgátlási próba (ami a mycoplasma azonosítás hagyományos eszköze) kivitelezése viszont rendkívül hosszadalmas, és sikerét gyakran veszélyezteti bakteriális vagy gombás kontamináció. A legnagyobb akadálya azonban a növekedésgátlási próbáknak a magas titerű, monospecifikus szérumok nehéz hozzáférhetősége. Vannak ugyan referens laborok, ahol előállítanak ilyen szérumokat, de kereskedelmi forgalomba ezekből nagyon kevés kerül (Avakian et al., 1988, Fan et al., 1995).

Az izolátumok azonosítására ezért számos egyéb módszert vezettek be az elmúlt két évtizedben, mint például az ecetsav-urea poliakrilamid gélelektroforézist (Rhoades et al., 1974), SDS-PAGE (Khan et al., 1987), Western-blottolást (Thomas és Sharp, 1988), különböző ELISA rendszereket (Thomas és Sharp, 1988, Stipkovits et al., 1993, Kaszanyitzky et al., 1994), immunfluoreszcenciás vizsgálatokat (Talkington és Kleven, 1983), a

membránfehérjék monoklonális ellenanyagokkal történő analizisét (Czifra et al., 1993) és IgG receptor kimutatást (Lauerman et al., 1993b). Minthogy ezek a módszerek azonban a fehérjék felől próbálták meg az azonosítást, még mindig igen munka- és időigényesek voltak. Napjainkban viszont a gyorsan fejlődő molekuláris biológiai eszközöket alkalmazzák, melyek kellően gyorsan, ugyanakkor specifikusan azonosítják (többek között) a mycoplasmákat is, nem egyszer addig nem ismert adatokat szolgáltatva róluk. Ezek a vizsgálatok eleinte a mycoplasmák teljes genomi DNS-ének restrikciós enzimekkel történő analizisét jelentették (Kleven et al., 1988, Ley és Avakian, 1992), később azonban a 16S riboszómális RNS-t, majd annak génjét célozták meg, egyrészt DNS próbákat használó hibridizációs kísérletekben (Yogev et al., 1988, Fernández et al., 1993, Johansson, 1993), majd PCR-el. A PCR során alkalmaztak faj-specifikus primereket (Jefferey et al., 1995) valamint genus-specifikus primereket is (Van Kuppeveld et al., 1992), ez utóbbit több esetben kombinálták RFLP-vel (Ros Bascuñana et al., 1994, Fan et al., 1995, Garcia et al., 1995). Legújabbán pedig a tetszőlegesen megválasztott primereket használó PCR (Arbitrarily Primed PCR, AP-PCR) alkalmazása terjedt el mind a mycoplasmák, mind számos más mikroorganizmus ujjlenyomatszerű azonosítására (Geary et al., 1994, Boerlin et al., 1995).

Vizsgálatainkban mi a PCR-t alkalmazzuk a 4 legfontosabb madár-patogén mycoplasma kimutatására és azonosítására: a *M. gallisepticum* esetében egy faj specifikus primer párt, a *M. iowae*, *M. meleagridis*, és a *M. synoviae* esetében pedig egy általános, a mycoplasmák jelentős hányadát kimutatni képes primer párt használtunk.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Mycoplasma tenyésztés és minta-előkészítés. A *Mycoplasma gallisepticum*, *M. iowae*, *M. meleagridis*, és *M. synoviae* referens törzsei rendelkezésre álltak a Svéd Nemzeti Állategészségügyi Intézetben (Uppsala, Svédország). A klinikai esetekből izolált mycoplasmák a Debreceni Állategészségügyi Intézet gyűjteményéből, vagy friss esetekből származtak. A mycoplasmák tenyésztését a már leírtak szerint végeztük (Frey et al., 1968; Jordan, 1983; Kaszanyitzky et al., 1994). A növekedésgátlási próbát Clyde, Jr. (1983) után végeztük, melyhez a londoni Central Public Health Laboratory-ból szereztük be a szükséges pozitív savókat. Az izolált és azonosított mycoplasmák levestenyészeteit -20°C -on tároltuk, és a későbbiek során ezekből a levesekből adtunk $1\ \mu\text{l}$ -t a PCR-hez.

Megvizsgáltuk annak a lehetőségét is, hogy a kórokozó előzetes izolálása nélkül is sikerülhet-e specifikus eredményhez jutni. Ezért 6 olyan állományból gyűjtöttünk mintákat, melyek szerológiailag korábban mycoplasmákkal fertőzöttnek bizonyultak (*M. gallisepticum* 1 állomány, *M. meleagridis* 3 állomány, *M. synoviae* 2 állomány). A szerológiai eredményeket a tenyésztési-növekedésgátlási próbák eredményei igazolták.

Kipróbáltuk a PCR-RFLP rendszer alkalmazhatóságát 11 újabb járvány adatainak feldolgozása során is úgy, hogy párhuzamosan elvégeztük a hagyományos vizsgálatokat is. Ez utóbbi esetekben a mintákat Ley et al. (1992) és Jefferey et al. (1995) szerint gyűjtöttük, a következő módon: steril tamponnal mintákat vettünk a légcsőből, a légzsákok faláról és a pericardiumról, a tüdőből és az agyvelőből pedig homogenizátumot készítettünk a boncolás után. A tamponokból és a homogenizátumokból Frey levest és agart oltottunk. A leveskultúrák $1\ \text{ml}$ -ét $12,000\ \text{g-n}$ centrifugáltuk 5 percig. A felülúszót elöntöttük, s az üledéket $50\ \mu\text{l}$ steril vízben reszuszpendáltuk, majd ebből használtunk $1\ \mu\text{l}$ -t a PCR-hez. A beoltott

táptalajokat 37°C-on inkubáltuk. A levesekből naponta vettünk mintát PCR-hez, az agarokat szintén naponta vizsgáltuk mycoplasma kolóniák jelenlétére.

Primer tervezés. A van Kuppeveld et al. (1992) által tervezett "általános" primereket Heleen Gerritsma (Department of Virology, Leiden University, Leiden, Holland) bocsátotta rendelkezésünkre. A GPO-3 jelzésű primer szekvenciája a következő volt: 5'-GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T-3', az MGSO jelzésű primer szekvenciája pedig: 5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3' volt. A *M. gallisepticum* kimutatására ill. kizárására faj-specifikus primer párt használtunk, melyek közül az "előre haladó" (forward) primer szekvenciája 5'-AAC ACC AGA GGC GAA GGC GAG G-3', míg a "visszafelé haladó" (reverse) primer szekvenciája 5'-ACG GAT TTG CAA CTG TTT GTA TTG G-3' volt.

A kísérletek elvégzése előtt (mivel a primerek először kerültek kipróbálásra madár mycoplasmák kimutatására) egy szekvencia kezelő szoftver segítségével (Primer Designer- Version 2.0; Scientific and Educational Software, State Line, Pa., USA) megvizsgáltuk a primerek illeszkedését a 4 mycoplasma faj GénBankban közölt szekvenciáira.

Polimeráz láncreakció. A PCR-t 50 µl reakcióelegyben végeztük, mely 5 µl-t tartalmazott a következő összetételű, 10-szeres koncentrációjú pufferből: 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, és 100 mM Tris-HCl, pH 9,0, valamint 2,5-2,5 µl-t az általános mycoplasma primerekből (60 ng/µl), ill. 1-1 µl-t a *M. gallisepticum* specifikus primerekből (35 pmol/µl), 0,2 µl-t (1 U) a *Taq* DNS polimerázból, 300 µM-t mindegyik dNTP-ből (dATP, dCTP, dGTP, és dTTP; Pharmacia LKB), és 1 µl-t a mycoplasma levestenyészetekből. A reakcióelegyet desztillált vízzel egészítettük ki 50 µl-re. A DNS sokszorozást DNA Thermal Cycler, (Perkin Elmer Cetus) automatában végeztük, az adenovírusoknál leírt lépések szerint.

A PCR termékek kimutatása. A PCR termékek kimutatása és az eredmények dokumentálása szintén az adenovírusoknál leírtak szerint történt, annyi eltéréssel, hogy ebben az esetben 100 bp-os DNS létrát használtunk molekulatömeg standardként (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA).

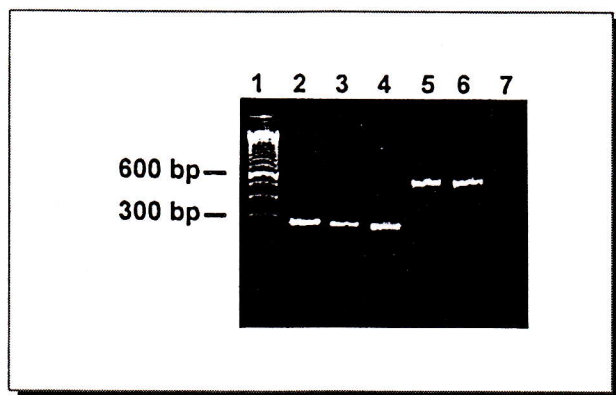
RFLP analízis. A mycoplasmák 16S rRNS-einek szekvenciáját a GénBank adatbázisából nyertük (Weisburg et al., 1989, Grau et al., 1991, Scamrov és Beabealashvilli, 1991, Pettersson et al., 1994). A restrikciós helyek megkeresését a fentebb említett szoftverrel végeztük el. A kapott adatok alapján két restrikciós enzim tűnt megfelelőnek az általános primerek felhasználásával nyert átlagosan 270 bp hosszú PCR termékek megkülönböztetésére, a *Bam*HI és az *Rsa*I. A restrikciós enzimes emésztéseket a használati utasítás szerint végeztük (New England Biolabs, Beverly, Mass. U.S.A.). Emésztés után a teljes reakcióelegyet megfuttattuk 2%-os, 0,5 µg/ml etidium-bromidot tartalmazó agaróz gélen, a kapott fragmentek hosszúságát 100 bp-os DNS létrával vetettük össze. Az eredményeket a fentiekhez hasonlóan dokumentáltuk.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

Az 1. ábra a 4 mycoplasma faj referens törzsein elvégzett PCR kísérlet eredményeit mutatja, mely során a reakcióelegyek mind a 4 primert tartalmazták. A *M. iowae*, *M. meleagridis*, és a *M. synoviae* esetében egy kb. 270 bp hosszúságú fragment látható, míg a *M. gallisepticum* két referens törzse esetében egy kb. 530 bp hosszúságú PCR termék látható. Ezt az eredményt alátámasztották a szekvencia elemzések adatai is, ahol vagy az egyik, vagy mindkét primer rossz illeszkedése miatt, a specifikus primerek alkalmatlannak bizonyultak a *M. iowae*, *M. meleagridis*, vagy a *M. synoviae*, az általános primerek pedig a *M. gallisepticum* vonatkozó génszakaszának fölerősítésére.

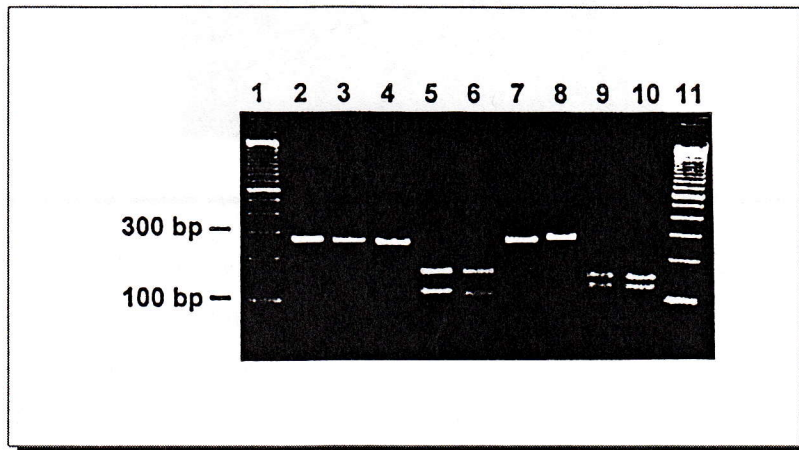
Az általános primerekkel a *M. iowae*-ből, *M. meleagridis*-ből, és a *M. synoviae*-ből fölerősített szakaszoknak a kiválasztott restrikciós enzimekkel történt vágása során keletkezett fragmenteket mutatja a 2. ábra.

A 3. ábra néhány, a Debreceni Állategészségügyi Intézetben korábban izolált és fagyasztva tárolt mycoplasma tenyészet PCR eredményeit mutatja, a 4. ábra pedig ugyanezen minták RFLP mintázatát. A vizsgált, összesen 17 izolátumból 3 *M. gallisepticum*-nak, 1 *M. iowae*-nak, 4 *M. synoviae*-nek, és 9 *M. meleagridis*-nek bizonyult mind a PCR-RFLP, mind a hagyományos vizsgálatok alapján. A különbség az volt, hogy a PCR már a levesek beoltása után 48 óra múlva eredményt adott pozitív esetben, míg a tenyésztés-növekedésgátlás csak 4-5 hét alatt szolgáltatta ugyanezt az eredményt.



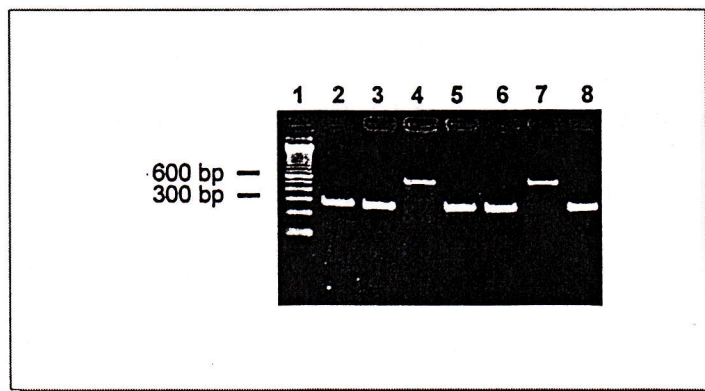
1. ábra. A 4 mycoplasma faj referens törzsein elvégzett PCR kísérlet eredményei, a reakcióelegyek mind a 4 primert tartalmazták. A számokkal jelölt oszlopokban a következő minták PCR termékeit futtattuk:

1: Molekulatömeg standard: 100 bp DNS létra; 2-6: a 4 primer keverékével nyert PCR termékek (2: *M. iowae*, 3: *M. meleagridis*, 4: *M. synoviae*, 5: *M. gallisepticum* S6, 6: *M. gallisepticum* X95), 7: negatív kontrol (fertőzetlen levestenyészet).



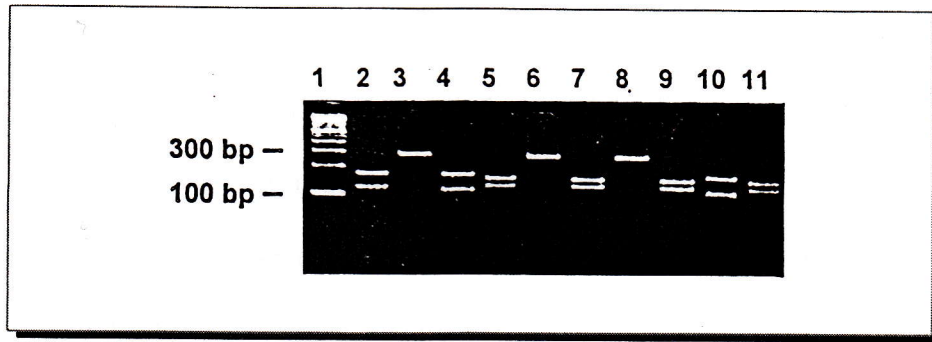
2. ábra. A *M. iowae*, *M. meleagridis*, és *M. synoviae* referens törzseiből szintetizált PCR termékek RFLP mintázata két restriktációs enzimmel történt vágás után.

1 és 11: Molekulatömeg standard: 100 bp DNS létra; 2: *M. iowae*, 3: *M. meleagridis*, és 4: *M. synoviae* vágatlan PCR terméke; 5: *M. iowae*, 6: *M. meleagridis*, és 7: *M. synoviae* *Rsa*I-gyel vágott PCR terméke; 8: *M. iowae*, 9: *M. meleagridis*, és 10: *M. synoviae* *Bam*HI-gyel vágott PCR terméke.



3. ábra. Baromfira patogén mycoplasmák izolátumainak PCR eredményei.

1: Molekulatömeg standard: 100 bp DNS létra; 2: *M. iowae*, 3: *M. meleagridis*, 4: *M. gallisepticum*, 5: *M. synoviae*, 6: *M. synoviae*, 7: *M. gallisepticum*, és 8: *M. meleagridis* PCR terméke.



4. ábra. A 3. ábrán mutatott PCR termékek RFLP mintázatai *RsaI* és *BamHI* enzimekkel történt vágások után, a *M. gallisepticum* PCR termékek kivételével.

1: Molekulatömeg standard: 100 bp DNS létra; 2 és 3: a *M. iowae*, 4 és 5: a *M. meleagridis*, 6 és 7: a *M. synoviae*, 8 és 9: a *M. synoviae*, 10 és 11: a *M. meleagridis* restriktációs mintázata.

KÖVETKEZTETÉS

A mycoplasmák azonosítására több, PCR-en alapuló megközelítést is alkalmaztak. Az egyikben faj-specifikus primereket használtak (Nascimento et al., 1991, Lauerman et al., 1993a, Slavik et al., 1993, Zhao és Yamamoto, 1993, és Jefferey et al., 1995), egy másikban pedig ún. "általános" primerek felhasználásáról és a PCR-t követő RFLP analizisről számoltak be (Ros Bascuñana et al., 1994). Újabban az AP-PCR technikát is sikerrel vették igénybe a mycoplasmák azonosítására, ahol egyetlen rövid, 10 nukleotid hosszúságú primer segítségével készítenek az ujjlenyomathoz hasonló specificitású képet egy adott organizmusról (Geary et al., 1994). Mi az első két módszert alkalmaztuk, mivel az általunk használt általános primer pár nem volt megfelelő a *M. gallisepticum* törzsek kimutatására. A *M. gallisepticum* specifikus primer viszont nagyon hatékonynak és specifikusnak bizonyult ugyanerre a célra. Kísérleteink ugyanakkor megmutatták, hogy a másik 3, gazdasági szempontból jelentős madár patogén mycoplasma kimutatására alkalmasak a Van Kuppeveld et al. (1992) által tervezett, eredetileg emberi ill. rágcsáló eredetű mycoplasmák kimutatására tervezett primerek. A felerősített PCR termékek azután mindössze 2 restriktációs endonukleáz felhasználásával

megkülönböztethetők egymástól. Ezért úgy találjuk, hogy a többi egyéb, PCR-en és azt követő RFLP-n alapuló módszerhez hasonlóan (mint például Fan et al., 1995) az általunk összeállított rendszer is egyszerű, de ugyanakkor gyors és hatékony kiegészítést jelenthet a mycoplasma meghatározás során. Tamponminták segítségével már egy munkanap alatt is eredményt érhetünk el a technikával pozitív esetben, de a tenyésztéssel kombinált PCR is sokkal hamarabb diagnózishoz vezet, mint a tenyésztés önmagában (Jefferey et al., 1995).

Eredményeink jól példázzák, hogy milyen hatékonyan illeszthetők be a modern molekuláris biológiai módszerek a rutindiagnosztikai eljárások közé. Intézetünkben tovább vizsgáljuk az említett általános mycoplasma primer alkalmazhatóságát kérődző és sertés eredetű mycoplasmák kimutatására. Úgy gondoljuk, hogy a mycoplasma azonosítás és kimutatás a PCR nagyon fontos felhasználási területévé válhat, mivel ezeket a mikroorganizmusokat nehéz és hosszú ideig tart izolálni.

5.4. A Derzsy-féle betegség diagnosztikája a polimeráz láncreakció felhasználásával

BEVEZETÉS

A ludak parvovírus (goose parvovirus, GPV) által okozott, világszerte elterjedt betegsége, a Derzsy-féle betegség jelentős gazdasági károkat okoz a nagy létszámú lúd és mosuszkacsa (*Cairina moschata*) állományokban (Kisary, 1993). A Derzsy-féle betegség a mi vizsgálati területünkön is az egyik leggyakrabban diagnosztizált bántalom, s gyakran képezi a lúdállományokat kihelyezők s azokat felnevelők között fellépő szavatossági perek tárgyát. A betegség kórjelzése hosszú időn keresztül a tipikus járványmeneten, a jellegzetes kórbonctani és kórszövettani elváltozásokon, valamint azon a megfigyelésen alapult, hogy a betegség a kislibák 4 hetes kora után gyakorlatilag nem fordul elő (Mészáros, 1985; Kecskeméti et al., 1996). A közelmúltban azonban többször is felmerült a betegség 4 hetesnél idősebb libákban való előfordulásának gyanúja is, de a bizonytalan klinikai tünetek és kórbonctani-kórszövettani leletek megnehezítették a diagnózis felállítását. Ezért felmerült az igény a GPV specifikus kimutatására az ilyen bizonytalan kórképek esetében. A vírus kimutatása a hagyományos módszerekkel eléggé nehézkes, ahhoz gyakran több vakpasszázs szükséges embrionált liba vagy mosuszkacsa tojásokban (Gough et al., 1981; Takehara et al., 1994). Gyakran nehezíti a GPV izolálását egyéb, kontamináló vírusok jelenléte a vizsgálandó mintákban, mint reo- vagy adenovírusok (Derzsy, 1967; Csontos, 1967). Igénybevehető az elektronmikroszkóp a vírusrészecskék kimutatására a fertőzött sejtekben, ahogy ezt a bursa és a szív esetében Bergmann (1987) leírta. Roszkowski és mtsai (1982) immunperoxidáz technikát dolgoztak ki, amellyel azonban csak a májszövetekből tudták kimutatni a vírust. Minthogy azonban ismertté vált a mosuszkacsa parvovírus "FM" törzsének, ill. a GPV "B" törzsének nukleotid-sorrendje (Zádori et al., 1995), más szerzőkhöz hasonlóan (Limn et al., 1996), 1997 tavasza óta mi is a PCR-t használjuk a vírus nukleinsavának gyors és hatékony kimutatására a fertőzött szövetekben.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Minta-előkészítés. Egy-egy állományból általában 10 élő állatot vagy hullát küldtek az intézetbe, ezek szerveit egyedileg dolgoztuk fel. A vírus DNS feltáráshoz a már korábban leírt, egyszerű fizikai eljárást használtuk (Kiss et al., 1996b) és a következők szerint végeztük: kb. 1 g máj ill. szívizom mintát 1:10 arányban homogenizáltunk desztillált vízben. Háromszori fagyasztás-felolvasztás után (-20°C -ról szobahőmérsékletre) a mintákat 10 percig forraltuk. Ezután a minták 1 ml-ét Eppendorf csövekbe öntöttük, és maximális fordulatszámon ($\sim 13,000$ rpm) 5 percig centrifugáltuk mikrocentrifugában. A felülúszó tizes léptékű hígításaiból 1 μl -t használtunk mintaként a PCR kísérletekben.

Kontrollok. A különböző külső pozitív kontrollok alapjául a GPV B törzsének (Kisary et al., 1978) 100 TCID₅₀ mennyisége szolgált. Négy pozitív kontroll csöbe a B vírus törzsoldata tízszeres hígításainak 1-1 μl -ét mértük be. Egy következő pozitív kontrollcsöbe a vizsgálandó anyagok (elegyminta) 300 μl -ének és a B vírus törzsoldata százszoros hígításának 10 μl -éből álló elegy 1 μl -e került, a PCR-t gátló anyagok esetleges jelenlétének kimutatására a vizsgálandó anyagban. Fertőzetlen állatokból származó szívizom és májszövetek valamint desztillált víz szolgáltak negatív kontrollként. Az összes kontroll csövet a mintafeltárásnál leírtak szerint előkezeltük.

Primerek. A primerek szekvenciáit a RekombiVet Kft., Pilisvörösvár, most szabadalmaztatja, ezért azokat nem közölhetjük.

Polimeráz láncreakció. A PCR-t 50 μl reakcióelegyben végeztük, mely 5 μl -t tartalmazott a következő összetételű, 10-szeres koncentrációjú pufferből: 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ és 100 mM Tris-HCl, pH 9,0, valamint 50 pmol mindkét primerből, 1 U Taq polimerázt, 300 μM -t mindegyik dNTP-ből (dATP, dCTP, dGTP, és dTTP; Pharmacia LKB), és 1- μl -t a feltárt szövet-homogenizátumokból ill. kontrollokból. A reakcióelegyet desztillált vízzel egészítettük ki 50 μl -

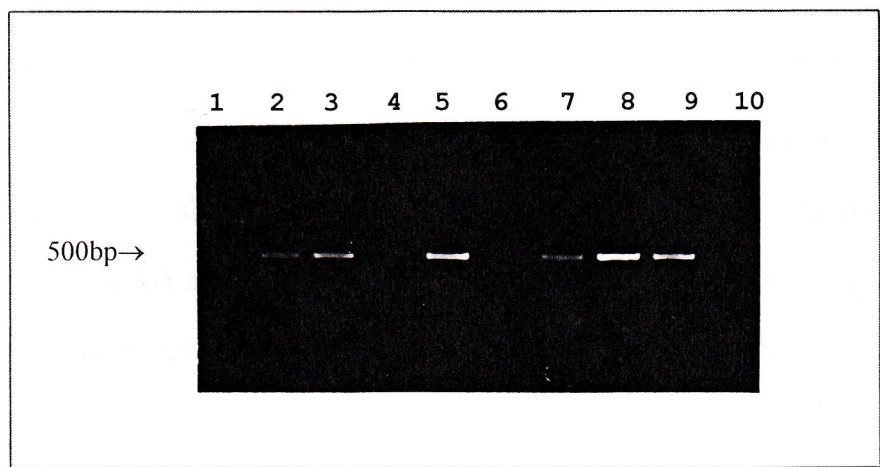
re. A DNS sokszorozást DNA Thermal Cycller (Perkin Elmer Cetus) automatában végeztük, az adenovírusok kimutatásánál leírtak szerint.

A PCR termékek kimutatása és az eredmények dokumentálása szintén az adenovírusoknál leírtak szerint történt, annyi eltéréssel, hogy ebben az esetben 100 bp-os DNS létrát használtunk molekulatömeg standardként (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA).

Vírusizolálás. A vírusizolálást Kisary és mtsai szerint (1978) végeztük. A homogenizált mintákat antibiotikumokkal egészítettük ki, és a szuszpenziók 200 µl-ét 10 napos embrionált lúdtojások allantois üregébe oltottuk. A tojásokat további 14 napig inkubáltuk, és naponta kétszer lámpáztuk. Az elhullott embriókat makroszkóposan vizsgáltuk szívizom- és májelváltozások jelenlétére. Azokban az esetekben, ahol a jellegzetes elváltozások (vérzések a savóshártyák alatt, ödéma a fejen, stb.) nem alakultak ki, az allantois-folyadékot különböző hígításaiból fenol/kloroformos kivonás és alkoholos kicsapás után PCR-t végeztünk a fentiek szerint.

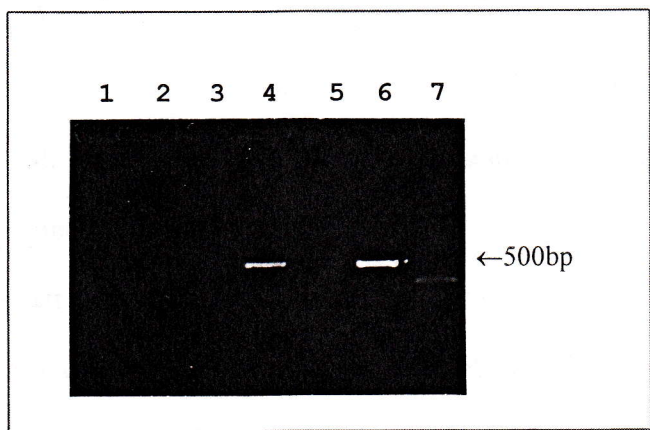
EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS.

Az 1. ábra tartalmazza néhány, a Derzsy-féle betegség gyanújával az intézetünkbe küldött libahulla szerveiből elvégzett PCR eredményét. Az ábra jól szemlélteti a GPV pozitív állományok egy tipikus eredményét, ahol ugyanis a 10 vizsgált állat mintájából általában 2-10 pozitívan reagál a PCR során. A 2. ábra egy olyan esetet mutat be, amikor a minta a PCR-t gátló anyagokat tartalmazott, melynek hatását a minta hígításával tudtuk kiküszöbölni.



1. ábra. A GPV jelenlétére vizsgált, egy állományból származó nyolc állat szívizom- és máj-homogenizátumának PCR eredményei. A számokkal jelölt oszlopokban a következő minták PCR termékeit futtattuk:

1: Molekulatömeg standard: 100 bp DNS létra; 2-9: az egyedileg bemérésre került szervmintákból származó PCR-termékek, 10: DNS helyett desztillált vizet tartalmazó negatív kontroll.



2. ábra. A PCR-t gátló anyagok jelenléte a mintában. A különböző összetételű és hígítású minták PCR eredményei.

1: elegyminta (egy állományból származó 10 állat szerv-homogenizátuma összekeverve); 2: pozitív kontroll (az előbb leírt elegyminta 300 μ l-e + 10 μ l "B" vírus keverékéből kivett 1 μ l-nyi minta); 3: DNS helyett desztillált vizet tartalmazó negatív kontroll; 4: a "B" vírus 10^4 -szeres hígítása, 5: pozitív kontroll (az A oszlopnál leírt minta 10^3 -szeres hígítása + 10 μ l "B" vírus keverékéből kivett 1 μ l-nyi minta), és 6: az elegyminta 10^3 -szeres hígításának PCR eredménye; 7: Molekulatömeg standard: 100 bp DNS létra.

Eddig 58, különböző helyről származó minta PCR vizsgálatát végeztük el, és a eredményeinkből a következőket állapítottuk meg: A PCR következetesen pozitív volt azokban az esetekben, ahol a betegségre jellemző klinikai tünetek, kórbonctani-kórszövettani elváltozások egyértelműek voltak, és az állatok életkora a betegség előfordulása szempontjából meghatározónak tartott 4. élethét alatt volt (34 eset). Azokban az esetekben azonban, amikor idősebb (6-8 hetes) állományokból származó mintákat vizsgáltunk, az eredmények már nem mindig voltak összhangban a klinikai ill. kórbonctani képpel. 10 esetben a hagyományos módszerek Derzsy-féle betegségre gyanút keltő eredményét nem támasztotta alá a PCR. Ilyenkor elvégeztük a vírusizolálást is embrionális lúdtojásokban, s az eredmények (az allantois-folyadékából elvégzett PCR-é is) negatívok lettek. Voltak viszont olyan esetek is, amikor a bizonytalan klinikai-kórbonctani kép mellett a PCR pozitív eredményt adott, s ezt megerősítették a vírusizolálás eredményei is (4 eset). Tíz, különböző helyről származó, és a Derzsy-féle betegség gyanújára sem utaló elváltozásokat mutató mintát mint negatív kontrollt vizsgálva a PCR (összhangban a kórbonctannal, kórszövettannal, valamint az antigén-kimutató ELISA és a vírusizolálás eredményeivel) minden esetben negatív volt.

A fentiekből levontuk azt a következtetést, hogy a PCR alkalmas, sőt, megelőzőbb az oktani diagnózis felállítására a vírusizolálásnál, mert: egyszerűbb, ugyanakkor érzékenyebb és lényegesen gyorsabb annál, elvégzését nem zavarja a specifikus ellenanyagok egyidejű jelenléte, míg a vírusizolálás rutincélú alkalmazását több tényező is nehezíti ill. kizárja, mint például az, hogy a köztenyésztésből származó embrionált lúdtojások szikellenanyagot tartalmazhatnak, az SPF tojás drága, beszerzése nehézkes, a tojástermelés szezonális, a vizsgálatok időigényesek. Ezért 1997 tavaszától vírusizolálás helyett a PCR-t alkalmazzuk a Derzsy-féle betegség oktani diagnózisának felállításához. Hozzá kell azonban tennünk, hogy a PCR csak mint a hagyományos vizsgálómódszerek kiegészítője jöhet szóba, s nem szabad diagnózist mondani egy egyszeri PCR eredmény alapján.

5.5. Pestivírusok kimutatása PCR-rel

BEVEZETÉS

A pestivírusok a sertés, juh és szarvasmarha állományok gazdaságilag fontos kórokozói (Baker, 1987). A *Flaviviridae* családba, azon belül a *Pestivirus* genusba tartozó kisméretű, burkos, pozitív egyszálú RNS genommal rendelkező, s a természetben általában nem citopatogén formában előforduló vírusok változatos kórképeket idéznek elő a megfertőzött állatokban. A genus tagjait eddig azután a gazda után nevezték el, amelyből azokat izolálták (szarvasmarhák vírusos hasmenésének vírusa, BVDV, a juhok border disease-ének vírusa, BDV, és az Európai sertéspestis vírusa, CSFV). A pestivírus kutatók újabban a genus tagjainak 4 különböző csoportba osztását javasolják: 1. típusú (klasszikus, I genotípusú BVDV törzsek), 2. típusú (sertéspestis vírustörzsek), 3. típusú ("igazi" border disease vírustörzsek) és 4. típusú pestivírusok (az eddigi BVDV II törzsek és néhány, juhokból izolált törzs) (Becher et al., 1995; Paton et al., 1995; Harasawa, 1996).

A legtöbb szarvasmarha állományban perzisztensen fertőzött, immuntoleráns állatok tartják fenn a BVDV fertőzést (Baker, 1987). A szarvasmarhák BVDV-vel való fertőződése általában szubklinikai formában zajlik le, és teljes felgyógyulás követi, de ritkán súlyosabb tüneteket is észleltek a fertőzés kapcsán (Corapi et al., 1990; Pellerin et al., 1994). A világ szarvasmarha állományainak széleskörű pestivírus fertőzöttsége miatt gyakori a különböző biológiai anyagok BVDV-vel, ill. a vírus elleni ellenanyagokkal való kontaminációja (King és Harkness, 1975; Baker, 1987). Amellett, hogy ez megnehezíti a diagnosztikai vizsgálatokat (Belák és Ballagi-Pordány 1993), a BVDV I ill. a BVDV II vírusok is bekerülhetnek mind humán, mind állatgyógyászati célra használt vakcinákba (Harasawa és Tomiyama, 1994). Ez utóbbi esetben nem egyszer tapasztaltak a kontamináló vírus által előidézett

megbetegedéseket sertés, kecske, juh, ill. szarvasmarha állományokban (Wensvoort és Terpstra, 1988; Løken et al., 1991).

Sertés állományokban a sertéspestis vírusa által kirobbantott járványok messze komolyabb kártételeket okoznak, mint bármely más pestivírussal történt fertőződés. A sertéspestis vírusának különböző, alacsony, közepes és magas virulenciájú törzseit is leírták (Van Oirschot, 1988), mivel azonban még az alacsony virulenciájú törzsek is kifejezetten főtopatogének, így ezek is nagy károkat okoznak a sertésenyésztésben. Ezért a sertéspestis járványok kitörésekor az érintett állományok teljes felszámolásával védekeznek a betegség további terjedése ellen. Ismert azonban, hogy a CSFV-n kívül más pestivírusok is fertőzhetik a sertéseket, néha az alacsony virulenciájú CSFV fertőzéshez hasonló klinikai képet mutatva (Terpstra és Wensvoort, 1988; Paton et al., 1992). Érthető tehát, hogy nagy jelentőséget kapnak azok a diagnosztikai módszerek, melyek képesek a CSFV biztonságos elkülönítésére az egyéb pestivírusoktól.

A pestivírusok diagnosztikájának hagyományos módszere a vírusizolálás és a víruseutralizáció, megfelelő antiszérumok segítségével. A monoklonális ellenanyagok használatának bevezetése nagyban hozzájárult a neutralizációs vizsgálatok fokozott érzékenységéhez és pontosságához (Edwards et al., 1991), ugyanakkor lehetővé tette a szövettenyészetektől független, egyszerre nagy mennyiségű minta feldolgozására képes ELISA módszerek kidolgozását (Wensvoort et al., 1988; Entrican et al., 1995). Mindazonáltal, a szövettenyészeteken alapuló vizsgálatok megmaradtak referencia vizsgálómódszereknek.

A pestivírusok jelenlétének kimutatására számos szerző alkalmazta a PCR-t (Belák és Ballagi-Pordány, 1993; Ridpath et al., 1993; Schmitt et al., 1994; Da Silva et al., 1995; Hamel et al., 1995; Horner et al., 1995; Radwan et al., 1995), de jól felhasználható a módszer a különböző izolátumok azonosítására is (Boye et al., 1991; De Moerlooze et al., 1993;

Hofmann et al., 1994; Vilček et al., 1994). Faj-specifikus primereket használtak a CSFV törzsek szelektív kimutatására (Katz et al., 1993; Wirz et al., 1993; Lowings et al., 1994), vagy a BVDV és a BDV törzsek elkülönítésére (Sullivan és Akkina, 1995).

Kiderítették, hogy a pestivírus-genom 5' UTR-ének (untranslated region, le nem fordított régió) 119-391. nukleotid közötti szakasza ún. belső riboszómakötő helyként (internal ribosome entry site; IRES) funkcionál, és ez a genomszakasz felelős a transzláció iniciálásáért (Le et al., 1995; Poole et al., 1995). Ez a régió erősen konzervatív, amit ki is használnak a pestivírusokat általánosan kimutató polimeráz láncreakciókban (Canal et al. 1996). Ahogy arra már a genus tagjainak besorolásakor is utaltunk, az 5' UTR IRES szekvenciákon kívül eső részei (gyakorlatilag az első 120 nukleotid) már jelentősen különbözhet a genotípusok között, lehetővé téve így a PCR-alapú genotipizálást (Deng és Brock, 1993).

A pestivírusok nagy gazdasági jelentősége miatt az azokat kimutató és azonosító PCR módszerünk két megközelítést alkalmaz. Ez azt jelenti, hogy használunk egy a Wirz et al., (1993) által leírt, a vírusgenom 5' UTR-re specifikus, így a pestivírusok általános kimutatására alkalmas primer párt, a BVDV és a CSFV elkülönítésére pedig (a BDV vizsgálatát nem céloztuk) típus specifikus primereket használunk (Katz et al., 1993; Da Silva et al., 1995; Hertig et al., 1991).

ANYAG ÉS MÓDSZER

A sertéspestis gyanújával PCR-re került kórbonctani minták csoportosítása. Kórtani szempontból a következő csoportosítás szerint végeztük a vizsgálatokat:

1. élő, beteg állat alvadásban gátolt véréből szeparált limfociták;

2. a betegség jellegzetes klinikai tüneteit (láz, hasmenés, bőrvérzések, keresztgyengeség) mutató, kiirtott/elhullott állatok a betegség heveny szakaszának megfelelő kórbonctani képpel (bőr-, vese-, húgyhólyag-vérzések, a nyirokcsomók vérzéses infiltrációja, vírusos agyvelőgyulladás);

3. kevésbé jellegzetes klinikai tünetek (hőemelkedés-láz, súlyos bélsárpangás, kipirult bőr, bágyadság), az elhúzódó formára jellemző kórbonctani elváltozások a kiirtott/elhullott állatokban (esetenként elhalások a tonsillákban, vérzések a vesékben ill. testszerte, butonok a vastagbélben, vérzéses-kruppos tüdőgyulladás, vírusos agyvelőgyulladás);

4. atipikus esetek: hőemelkedés, fokozatos étvágycsökkenés, sárgás hasmenés bélsárpangással váltakozva, csököttség, ill. a szövödményekre jellemző klinikai tünetek; a kórboncolás során pedig 1-2 bőrvérzést ill. vesevérzéseket lehetett megfigyelni, s néhány esetben enyhe fokú vírusos agyvelőgyulladást tapasztaltunk;

5. sertéspestis gyanújával intézetbe küldött, de nem sertéspestisnek bizonyult esetek, melyeknél a klinikai tünetek között étvágytalanság, hőemelkedés-láz, hasmenés, a bőr lilás elszíneződése szerepelt. A kórbonctani/kórszövettani és virológiai vizsgálatok során sikerült kizárni a betegség gyanúját (szívbelhártya-gyulladás, szeptikus folyamatok, Aujeszky-féle betegség, sertéspestis-konjugátummal való IF negativitás).

A rendszer érzékenységének meghatározásához a vizsgált szervek homogenizátumának 10-es léptékű hígításait használtuk fel.

A CSFV kimutatására használt primerekkel kapott eredmények kontroljaként az Országos Állategészségügyi Intézet immunfluoreszcenciás vizsgálatainak eredményeit használtuk.

A BVDV-rendszerhez a NADL referens törzset használtuk pozitív kontrollként.

RNS kivonás. Az RNS kivonást a következők szerint végeztük: a CSFV kimutatásához szervmintákat gyűjtöttünk a vizsgált sertéshullák tonsilláiból, a vesékből, a lépből, nyirokcsomókból, az agyvelőből, és az alvadásban gátolt vérből szeparált limfocitákból, a BVDV kimutatásához pedig az elváltozott nyálkahártya területekről, a bélfodri nyirokcsomókból, a Peyer plakkokból, és szintén az alvadásban gátolt vérből szeparált limfocitákból. Az RNS kivonás lépéseit Chomczynski és Sacchi (1987) eljárása alapján végeztük, az alábbiak szerint: a szervmintákat 1:10 arányban steril desztillált vízben homogenizáltuk, a fehérvérsejt szuszpenziót szintén desztillált vízzel egészítettük ki 150 µl-re. A szövet-homogenizátumok 150 µl-ét, és az ugyanennyire kiegészített fehérvérsejt szuszpenziót 400 µl 6 M guanidin izotiocianáttal (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) kémcsőkeverővel összekevertük, és 10 percig szobahőn állni hagytuk. Ezután 220 µl 5 M nátrium-klorid oldatot adtunk az elegyhez, rövid ideig kémcsőkeverővel kevertük, majd 10 percre jégre helyeztük. A következő lépésként kloroformos kivonást végeztünk (250 µl kloroformot adtunk minden csőhöz, óvatos mozdulatokkal összekevertük a reakcióelegyeket), majd 15,800 g-n, 4°C-on 10 percig centrifugáltuk a csöveket. A felülúszókból 600 µl-t új csövekbe mértünk, s 360 µl, 95%-os etanol hozzáadása után 20 percre -75°C-os hűtőbe helyeztük az oldatokat. A kicsapott RNS ülepítését 15,800 g-n, 4°C-on 30 percig tartó centrifugálással végeztük. A (néha szabad szemmel nem is észlelhető) üledéket kétszer mostuk 70%-os alkohollal, majd szárítás után 30 µl DEPC-kezelt (dietil-pirokarbonát, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) vízben feloldottuk.

A NADL referens törzssel fertőzött MDBK sejteket az adenovírusoknál leírt módon fizikailag feltártuk, s a továbbiakban a fentieknek megfelelően kezeltük.

Primerek. Az irodalomból kiválasztott primer-jelöltek (Wirz és mtsai, 1993; Katz és mtsai, 1993) céljainkra való alkalmasságát a már említett szekvencia kezelő programmal

ellenőriztük (Primer Designer Version 2.0) a GenBank-ban rendelkezésre álló pestivírus szekvenciákon.

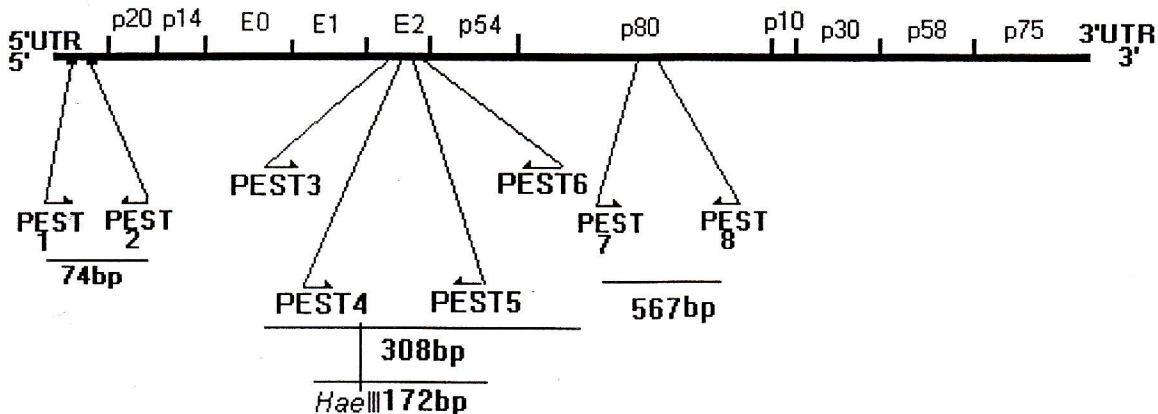
A primerek szekvenciáját az 1. táblázat, a szimbolizált pestivírus genomon való elhelyezkedésüket pedig az 1. ábra mutatja.

1. táblázat. A BVDV és CSFV kimutatására használt primerek nukleotid-sorrendje.

primer jelölése	szekvencia	pozíció (nukleotidok)	specifitás
PEST 1	5' - CCTGATAGGGTGCTGCAGAG - 3'	(300-319)	genus
PEST 2	5' - TCAACTCCATGTGCCATGTAC - 3'	(373-353)	genus
PEST 3	5' - ATATATGCTCAAGGGCGAGT - 3'	(3378-3398)	CSFV
PEST 4	5' - CTGTGGCTAATAGTGACCTAC - 3'	(3499-3519)	CSFV
PEST 5	5' - CATTTCTTTATGGGCTCATC - 3'	(3650-3671)	CSFV
PEST 6	5' - ACAGCAGTAGTATCCATTTCTTTA - 3'	(3664-3686)	CSFV
PEST 7	5' - AAGAAGCTAAAAGCTAARGGCTAYAA - 3'	(6668-6693)	BVDV
PEST 8	5' - CGGGACCTGGACTTCATAGC - 3'	(7255-7235)	BVDV

(Katz et al., 1993 után).

1. ábra. A BVDV és CSFV kimutatására használt primerek elhelyezkedése a szimbolizált pestivírus genomon (Katz et al., 1993; és Wirz et al., 1993 után).



cDNS szintézis. A cDNS szintézisét a First Strand cDNA Synthesis készlettel (Pharmacia LKB, Uppsala, Svédország) végeztük a használati utasítás szerint. Primerként 25 pmol mennyiségben felhasználtuk mind a kitben rendelkezésünkre bocsátott random hexamer oligonukleotidokat, mind az ún. reverz specifikus primert a nagyobb mennyiségű specifikus cDNS képződése érdekében. A reverz transzkripció befejezése után 95°C-on inaktiváltuk a reverz transzkriptáz aktivitást, és 1 µl reakcióelegyet használtunk mintaként a következő PCR lépésben.

PCR és a keletkezett termékek kimutatása. A PCR-t 50 µl reakcióelegyben végeztük, mely 5 µl-t tartalmazott a következő összetételű, 10-szeres koncentrációjú pufferből: 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, és 100 mM Tris-HCl, pH 9,0, valamint 25 pmol mindkét primerből, 1 U Taq polimerázt, 300 µM-t mindegyik dNTP-ből (dATP, dCTP, dGTP, és dTTP; Pharmacia LKB), és 1 µl-t a befejezett reverz transzkripció oldatából. A reakcióelegyet desztillált vízzel

egészítettük ki 50 µl-re. A DNS sokszorozást DNA Thermal Cycler, (Perkin Elmer Cetus) automatában végeztük, az adenovírusok kimutatásánál leírtak szerint. A PCR termékek kimutatása és az eredmények dokumentálása szintén az adenovírusoknál leírtak szerint történt, annyi eltéréssel, hogy ebben az esetben 100 bp-os DNS létrát használtunk molekulatömeg standardként (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA).

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

Vizsgálataink eredményeit az 2. és 3. ábra mutatja. A pestivírusok általános kimutatására képes primerek a genom 5' UTR-ére specifikusak, s erre a célra mi egy igen érzékenynek bizonyult primer párt választottunk (mely a 385 nukleotid hosszúságú szakaszból a 300-374. nukleotid közötti részt erősíti fel), s amelyik nagy biztonsággal és érzékenységgel mutatta ki a Wirz és mtsai (1993) által vizsgált 34 pestivírus törzset. A CSFV-specifikus primerek általában az E2 felszíni, neutralizációért felelős glikoproteint kódoló szekvencia egy darabját sokszorozzák meg (Yu és mtsai 1993). A régióban mi egy nested primer párt választottunk (a 3378.-3686. ill. 3499-3671 nukleotidok közötti szakaszt közrefogva), mely még egy *Hae*III vágáshelyet is tartalmazott (Katz et al., 1993). A BVDV estében ismert, hogy a vírusgenom két legkonzervatívabb szakasza az 5' UTR és a p80/125 fehérjét kódoló régiója. Mi az utóbbit választottuk, mert jóval hosszabb PCR fragment szintetizálható róla, mely a későbbiek során alaposabb vizsgálatok elvégzésére is felhasználható.

Az irodalmi adatok is és az intézetünkben fellelhető pestivírusokkal elvégzett vizsgálatok is bizonyították a rendszer specifikusságát. A CSFV és BVDV specifikus primerek csak a megfelelő vírusokat mutatták ki, "keresztreakció" nem tapasztaltunk. A CSFV esetében a primer párok érzékenységét a betegség heveny formájában elhullott állat

lép-dörzsölékével elvégzett hígítási kísérleteink során vizsgáltuk, mivel az irodalmi adatok szerint ezek a minták adtak a legnagyobb hígításban pozitív reakciót a PCR kísérletekben (akár 1-10 TCID₅₀ mennyiségű vírust is kimutattak; Katz et al., 1993; Wirz et al., 1993). Az "általános" primer pár 10³-szoros hígítás után is pozitív reakciót adott. Az E2 régió belül elhelyezkedő, sertéspestisvírus-specifikus primerek szintén a szerv-dörzsölékek 10³-szoros hígításával adtak még pozitív reakciót. A legérzékenyebbnek az előbb említett primer pár belső, nested párai bizonyultak (a 3499-3671. nukleotidok közötti szakaszt közrefogva), mert a vizsgált anyagok 10⁴-szeres hígításnál is pozitív reakciót kaptunk. Érdekes módon, a külső primerekkel elvégzett PCR kísérletek már negatív eredményt adó reakcióelegyeit mintaként használva a nested primerek alkalmazása csak 10¹-szeres érzékenység növekedést eredményezett.

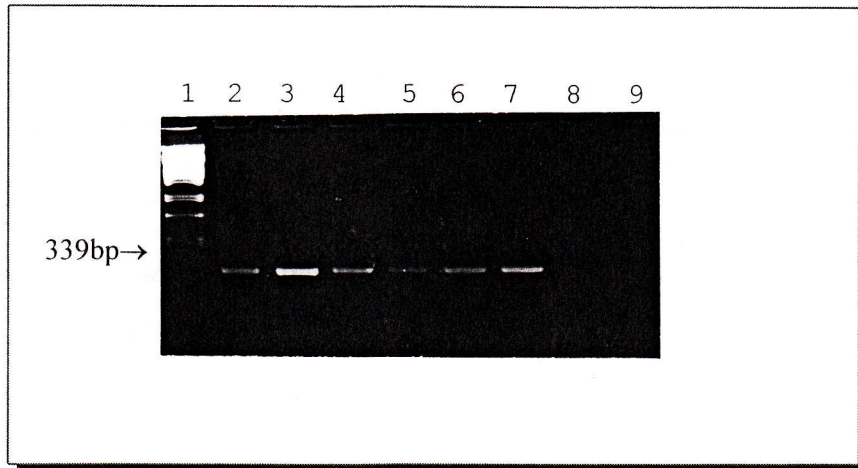
A különböző szervekkel elvégzett kísérleteink során (a betegség heveny szakaszában elhullott állat szerveit, mint standard mintákat felhasználva) azt az eredményt kaptuk, hogy a lép és a tonsillák azonos, 10⁴-szeres hígításban adtak pozitív reakciót a nested PCR során, míg a többi vizsgált szerv dörzsöléke (nyirokcsomók a test különböző területeiről, szeparált limfociták, agyvelő,) ezerszeres hígítás után már negatív eredményt adott. Munkahígításnak így megfelelőnek találtuk a százszoros hígítást és ezt alkalmaztuk a BVDV kimutatását célzó kísérleteinkben is.

A CSFV rendszer alkalmazhatóságát hosszabb ideig (14 nap) szobahőmérsékleten tárolt szervminták feldolgozásával is vizsgáltuk, s ekkor is sikerült kimutatnunk a vírust.

A kórtani alapon csoportosított és általunk vizsgált 57 sertés szervmintából 2 az első, 27 a második, 12 a harmadik és 7 a negyedik kategóriába tartozott, s a vizsgált minták minden esetben pozitív PCR eredményt adtak. A negatív kontrollként használt utolsó csoport 9

anyaga PCR negatív volt. Eredményeink minden esetben megegyeztek az Országos Állategészségügyi Intézetben elvégzett IF vizsgálatok eredményével.

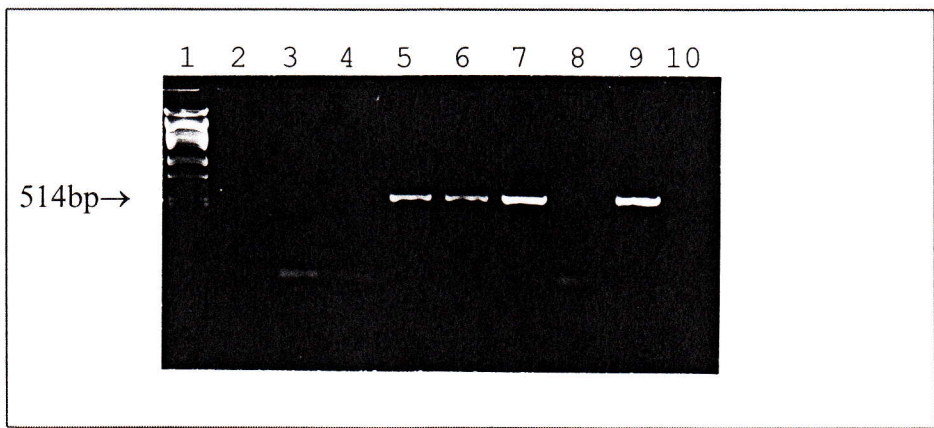
A BVDV-specifikus PCR-rel négy, gyakorlatból származó eset kapcsán sikerült a vírusgenom jelenlétét kimutatni, az említett szervmintákból ill. az alvadásban gátolt vérmintákból elkülönített limfocitákból. Az eredményeket a minták primer borjúhere szövettényészeteken történt szaporításával, majd néhány passzázs után elvégzett, a p80/125 fehérjére specifikus antigén kimutató ELISA-val (Rhone Merieux, Lyon, Franciaország) ellenőriztük. A pozitív kontrollként használt BVDV referens törzssel (NADL) minden esetben pozitív reakciót kaptunk.



2. ábra. A különböző kórtani csoportokból származó sertés szerv minták RT-PCR eredményei a CSFV specifikus, "külső" primerekkel.

A betűkkel jelölt oszlopokban a következő minták PCR termékeit futtattuk:

1: Molekulatömeg standard: λ fág DNS *Pst*I-gyel emésztve; 2 és 3C: az 1. kórtani csoportba, 4 és 5: a 2. kórtani csoportba, 6: a 3. kórtani csoportba, 7: a 4. és 8: az 5. kórtani csoportba tartozó állatok mintáinak 10^2 -szoros hígításaiból elvégzett RT-PCR eredményei, 9: cél-DNS helyett desztillált vizet tartalmazó negatív kontroll.



3. ábra. BVD gyanújával vizsgálatra beküldött állatok szerv mintáinak RT-PCR eredményei a pestivírus genus-specifikus és a BVD-specifikus primerekkel.

1: Molekulatömeg standard: λ fág DNS *Pst*I-gyel emésztve; 2-4: három (különböző állományból származó) állat szervmintáinak RT-PCR eredménye a genus-specifikus, és 5-7: a BVDV-specifikus primerekkel. 8-9: ugyanezekkel a primerekkel elvégzett RT-PCR a NADL referens törzzsel fertőzött MDBK szövettenyészet felülúszóján. 10: minta helyett desztillált vizet tartalmazó negatív kontroll.

KÖVETKEZTETÉSEK

A PCR gyorsasága, érzékenysége és nagyfokú specificitása miatt alkalmasnak bizonyult a CSFV és a BVDV gyors (1 munkanap) és hatékony kimutatására. A vírustitrálást nem volt módunkban elvégezni, a szerv-dörzsölékekből folytatott hígítási kísérletek azonban meggyőztek bennünket arról, hogy a módszer érzékenysége megfelel a rutindiagnosztika igényeinek. Az irodalmi adatok alapján (ahol 100 mg szövetből 10^4 ill. fészkes primerekkel $10 \cdot 10^2$ TCID₅₀ vírust mutattak ki), számításaink szerint a mi rendszerünkkel is sikerült $10 \cdot 10^2$ TCID₅₀ vírust kimutatnunk.

Mivel a vírus jól kimutatható volt az idült esetekből és a hosszabb ideig szobahőn tárolt mintákból is (ami kihasználható a nem friss, például vaddisznóhullák vizsgálata során), valamint alvadásban gátolt vérből szeparált limfocitákból is (amely járványtani nyomozás során nyújthat értékes segítséget), úgy gondoljuk, hogy a rendszer hatékonyan képes bővíteni a sertéspestis kórhatározására igénybevehető diagnosztikai eljárásokat.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kidolgozása óta a polimeráz láncreakció (PCR) térhódítása rohamos volt mind az alap-, mind az alkalmazott kutatások területén, így a diagnosztikában is. A technika nagyfokú érzékenységén, specifikusságán, és nem utolsósorban gyorsaságán alapul széleskörű felhasználása, melyet egyre kiterjedtebben vonnak be a rutindiagnosztikai eszközök tárába. A módszer hazai alkalmazására az állatorvosi diagnosztika területén azonban ez idáig nem került sor. Munkám célja ezért az volt, hogy kipróbáljam és lehetőség szerint bevezessem a módszert a diagnosztikai munka azon területeire, ahol indokoltan és megfelelően kihasználhatók a PCR egy vagy több tulajdonsága által nyújtott előnyök.

Intézetünkben 1994 őszén állítottuk össze a PCR-labort, a rutindiagnosztika igényeinek kielégítését szemelőtt tartva. Vizsgálatainkat modellkísérletekkel kezdtük, melyek során különböző adenovírus törzsek PCR-el való kimutathatóságát vizsgáltuk meg. A humán adenovírusok (HAV) általános kimutatására tervezett polimeráz láncreakciós primerek a szarvasmarha (BAV), sertés (PAV), és juh (OAV) adenovírusok megfelelő hexongén részletének felerősítésére is alkalmasnak mutatkoztak. Újabb BAV DNS szekvencia adatok ismeretében módosítottuk a primereket. A PCR körülményeinek optimalizálásával az összes rendelkezésre álló BAV szerotípus specifikus méretű terméket adott, beleértve a legújabban leírt BAV-10 referenciatörzset, valamint annak jellegzetesen eltérő genomú variánsait is. Az előkísérleteinkben tisztított vírus DNS-t alkalmaztunk templátként, kiküszöbölve ezzel a minta feltárásából származó esetleges problémákat. A kutya adenovírusai közül a Rubarth-kór okozóját (CAV-1) azonban közvetlenül a betegségben elhullott állat májából sikerült kimutatnunk. A klinikai mintákból történő DNS feltárás módszereit összehasonlítva megállapítottuk, hogy bár a fenolos kivonás nagyobb mennyiségű és tisztább DNS-t

eredményez, a szövetek többszöri fagyasztásával és felolvasztásával a sejtekből kiszabadított vírus hőkezelése a rutindiagnosztikának megfelelő mennyiségű és minőségű DNS-t eredményez, kiküszöbölve az egészségre ártalmas vegyszerek használatát. A továbbiakban valamennyi DNS kiindulási alapú PCR-ben (a Derzsy-féle betegség kórokozóját ill. mycoplasmákat kimutató eljárások) ezt az egyszerű mintafeltárást alkalmazzuk.

A mycoplasmosisok diagnosztikájának általánosan ismert körülményei (hosszú tenyésztési idő, keresztreakciók a gyakran nem megfelelő érzékenységű szerológiai vizsgálatok során) indokolták, hogy a következő lépésben ezeknek a kórokozónak a kimutatására alkalmazzuk a PCR-t. Vizsgálatainkban egy általános, a mycoplasmák 16S rRNS génjének konzervatív régiójára specifikus, így a *Mycoplasma* genus számos tagját kimutatni képes primer pár felhasználhatóságát vizsgáltuk meg a négy legfontosabb baromfi-patogén mycoplasmára. A primer pár használatával a megfelelő, közel azonos méretű PCR terméket nyertük a *M. iowae*, *M. meleagridis* és a *M. synoviae* referens törzseiből, valamint ezek izolátumaiból is. A PCR termékekből restrikciós enzimek felhasználásával készült vágási kép alapján a három faj egymástól jól elkülöníthető. A *M. gallisepticum* kimutatására és azonosítására egy fajspecifikus primer párt használtunk.

Az eljárás jól alkalmazkodik a rutindiagnosztikai igényekhez, mivel pozitív esetben már egy nap alatt specifikus eredményhez juthatunk, akár tamponmintát, akár 1-2 napos levestenyészetet felhasználva kiindulási anyagként, ami jelentős előrelépés a mycoplasmák azonosításában.

1996 tavaszától a Derzsy-féle betegség diagnosztikájához is használjuk a PCR-t a hagyományos vizsgáló módszerek kiegészítőjeként. A technika igénybevételével a kórisme felállítása egyértelműbb lett azokban az esetekben, amikor a kórbonctani, kórszövetteni kép nem igazít útba teljes biztonsággal. A PCR-el kapott eredményeinket eleinte vírusizolálással

támasztottuk alá, mivel azonban megállapítottuk, hogy a megfelelő kontrolok alkalmazásával végrehajtott PCR (ebben az esetben) minden tekintetben átveheti a vírusizolálás szerepét, 1997 eleje óta már csak a PCR-t alkalmazzuk kiegészítőként az oktani diagnózis felállításához.

Az RNS vírusokat kimutató PCR rendszer az RNS bontó enzimek nagyfokú ellenállóképesége, valamint az RNS komplementer DNS-sé (cDNS) történő átírásának szükségessége miatt több lépést, nagyobb odafigyelést igénylő feladat. Intézetünkben a guanidin-izotiocianát használatán alapuló RNS tisztítási eljárást, a cDNS szintéziséhez pedig egy a kereskedelmi forgalomban lévő átíró készletet alkalmazunk.

A *Pestivirus* genus tagjainak szoros antigénszerkezeti rokonsága diagnosztikai problémák forrása lehet elsősorban a sertéspestis vírusának (CSFV) kimutatása és azonosítása során. Reverz transzkripció után a vírusgenom CSFV-specifikus szakaszainak a polimeráz láncreakció (RT-PCR) felhasználásával történő vizsgálata jelentősen csökkentheti ezeket a hibaforrásokat. Egy ilyen módszert állítottunk össze 1996 őszén az irodalmi adatok alapján. A bő egy munkanap alatt kivitelezhető technikát alkalmasnak találtuk a klasszikus diagnosztikai eljárások eredményeinek megerősítésére, különös tekintettel azok specifikusságára. A módszer előnyét többek között abban látjuk, hogy alkalmazható élő állatokból származó vérminták, valamint hosszabb ideig tárolt anyagok vizsgálatára is.

Az előző eljárás alapjain nyugszik a szarvasmarhák vírusos hasmenésének vírusát (BVDV) kimutató RT-PCR rendszerünk is, melynek segítségével már több gyakorlati eset kapcsán megerősítettük a betegség klinikai tünetek és kórbonctani elváltozásokra alapozott gyanúját.

A kórokozók egyszerű kimutatásán túl a PCR hasznos segítséget nyújthat a járványtani nyomozások során is, amikor a megfelelő méretű PCR terméket vagy radioaktívan vagy egyéb

módon (pl. digoxigeninnel) jelölt próbával hibridizálják (Southern-hibridizáció), vagy restrikciós endonukleázokkal hasítják (restriction fragment length polymorphism, RFLP), vagy a duplaszálú PCR terméket denaturálva natív-poliakrilamid gélben futtatják, ahol akár egy nukleotid-eltérés is megváltozott, észlelhető futási karakterisztikát okoz (single-strand conformational polymorphism, SSCP technika), illetve rögtön meghatározzák a termék nukleotid-sorrendjét, lehetővé téve ezzel az adott kórokozó részletekbe menő tipizálását is. Az így nyert adatok segítségével azután az egyes izolátumokat kétséget kizáróan lehet azonosítani. A jövőben indokolt esetekben mi is kiterjesztjük vizsgálatainkat ebbe az irányba.

Tapasztalatainkat összegezve elmondhatjuk, hogy a PCR a gyakorlatban jól alkalmazható, hasznos segédeszköze az állatorvosi diagnosztikának. A technika természetéből adódóan nagy körültekintést igényel azonban a téves pozitív ill. negatív reakciók kiküszöbölése, ahogy erre korábban is többen felhívták a figyelmet. Hangsúlyozzuk azt is, hogy vizsgálataink soha nem nélkülözhetik a hagyományos diagnosztikai eljárásokat, különösen egy adott kórokozó izolálását. A nehezen kimutatható, illetve a járványtani indokok miatt gyors diagnózist igénylő helyzetekre vonatkozóan azonban fokozottan nagy jelentőséggel bíró módszer került birtokunkba, melynek felhasználási köre várhatóan egyre bővül majd hazánkban is.

Legfontosabb eredményeim

1. Állatorvosi diagnosztikai célú PCR laboratóriumot szerveztünk hazánkban elsőként, a Debreceni Állategészségügyi Intézetben.
2. Kimutattuk, hogy az eredetileg a humán adenovírusok kimutatására szolgáló primerek kismértékű módosítás után jól alkalmazhatók számos állati adenovírus kimutatására is, beleértve a legújabban leírt BAV-10 szerotípus izolátumait is.
3. Az adenovírusok kimutatását szolgáló PCR eljárással több gyakorlati esetben is segítettük a diagnózis felállítását a kutyák fertőző májgyulladásának esetében, kórokozó jelenlétének megerősítésével vagy kizárásával. A szervminták feldolgozásához egy egyszerű, az egészségre ártalmatlan kémiai anyagokat kiküszöbölő fizikai eljárást vezettünk be, ennek hatékonyságát bizonyítottuk.
4. Bevezettük a PCR-t a baromfira patogén mycoplasmák diagnosztikájába. Az alkalmazott módszerrel lényegesen rövidítettük a négy legfontosabb mycoplasma faj kimutatásához és meghatározásához szükséges időt.
5. A Derzsy-féle betegség oktani diagnózisához bevezettük a PCR rutinszerű alkalmazását. Megállapítottuk, hogy a vírusizolálás helyettesíthető a PCR-rel a lúd parvovírus esetében.
6. A sertéspestis vírusának kimutatására az irodalomból adaptált módszert vezettünk be. Az eljárás segítségével gyorsan, specifikusan és hatékonyan tudjuk kimutatni a kórokozó jelenlétét akár élő állatból is, akár olyan mintákból, melyek az egyéb, hagyományos vizsgálómódszerek számára már nem megfelelő állapotúak.
7. A szarvasmarhák vírusos hasmenése kórokozójának kimutatására alkalmazott PCR eljárás segítségével több, gyakorlatból származó minta esetében erősítettük meg a betegség gyanúját.

7. IRODALOM

- Adair, B. M., McKillop, E. R., Smyth, J. A., Curran, W. L., and McNulty, M. S. (1996): Bovine adenovirus type 10: properties of viruses isolated from cases of bovine haemorrhagic enterocolitis. *Vet. Rec.* 138, 2250-2252.
- Allard, A. (1992): Enteric adenovirus type 41. Genome organisation and specific detection procedures. Ph.D. Thesis, Department of Virology, University of Umeå, Umeå, Sweden
- Allard, A., Girones, R., Juto, P., and Wadell, G. (1990): Polymerase chain reaction for the detection of adenoviruses in stool samples. *J. Clinical Microbiol.* 28, 2659-2667.
- Ansari-Lari, M. A., Jones, S. N., Timms, K. M., and Gibbs, R. A. (1996): Improved ligation-anchored PCR strategy for identification of 5' ends of transcripts. *BioTechniques* 21, 34-38.
- Avakian, P. A., 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.
- Bailey, A. and Mautner, V. (1994): Phylogenetic relationships among adenovirus serotypes. *Virology* 205, 438-452.
- Baker, J. (1987): Bovine viral diarrhea virus: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190, 1449-1458.
- Ballagi-Pordány, A., Klintevall, K., Merza, M., Klingeborn, B., and Belák, S. (1992): Direct detection of bovine leukemia virus infection: practical applicability of a double polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. B.* 39, 69-77.

- Bartha, A. (1969): Proposal for subgrouping of bovine adenoviruses. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 19, 319-321.
- Becher, P., König, M., Paton, D. J., and Thiel, H.-J. (1995): Further characterization of border disease virus isolates: evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus. *Virology* 209, 200-206.
- Belák, S. (1990): Ovine adenoviruses. In: Dinter, Z., Morein, B. (eds.) *Virus Infections of Ruminants. Virus Infections of Vertebrates 3.* Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, Chap. 17, 171-185.
- Belák, S. és Ballagi-Pordány, A. (1992): Vírusfertőzések kimutatása nukleinsav-sokszorozással (-amplifikációval). *Magyar Állatorvosok Lapja*, 47. 648-656.
- Belák, S. and Ballagi-Pordány, A. (1993): Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Vet. Res. Comm.* 17, 55-72.
- Belák, S., Berencsi, Gy., Rusvai, M., Lukács K., and Nász, I. (1983): DNA structure and hemagglutination properties of bovine adenovirus type 2 strains which bypass species specificity. *Arch. Virol.* 77, 181-194.
- Benkő, M. (1990): Hasítottkörmű háziállatok adenovírusainak nukleinsav-vizsgálatokkal történő jellemzése és összehasonlítása. Kandidátusi értekezés, A Magyar Tudományos Akadémia Állatorvostudományi Kutatóintézete, Budapest.
- Benkő, M. and Harrach, B. (1990): Restriction enzyme mapping of bovine adenovirus type 1. *Acta Vet. Hung.* 38, 281-284.
- Benkő, M. and Harrach, B. (1994): Identification of the proteinase gene of bovine adenovirus type 4. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 41, 323.
- Benkő, M., Bartha, A., and Wadell, G. (1988): DNA restriction enzyme analysis of bovine adenoviruses. *Intervirology* 29, 346-350.

- Benkő, M., Harrach, B., and D'Halluin, J. C. (1990): Molecular cloning and physical mapping of the DNA of bovine adenovirus serotype 4; study of the DNA homology among bovine, human and porcine adenoviruses. *J. Gen. Virol.* 71, 465-469.
- Benkő, M., Smyth, J. A., Adair, B. M., and Harrach, B. (1995): Genome typing of adenovirus isolates from fatal enterocolitis cases of cattle for the elaboration of a rapid diagnostic method. In: Schwyzer, M., Ackermann, M., Bertoni, G., Kocherhans, R., McCullough, K., Engels, M., Wittek, R. and Zanoni, R. (eds.): *Immunobiology of viral infections. Proc. 3rd Congress Europ. Soc. Vet. Virol.* 484-488.
- Berencsi, Gy. és Minárovits, J. (1997): Virális genomok kimutatása. In: Kopper, L., Marcsek, Z., and Kovalszky, I. (eds.): *Molekuláris Medicina. Medicina, Budapest* pp. 81-85.
- Bergmann, V. (1987): Pathology and electron microscopical detection of virus in the tissues of goslings with Derzsy's disease (parvovirus infection). *Arch. Experiment. Vet. Med.* 41. 212-221.
- Boerlin, P., Bannerman, E., Ischer, F., Rocourt, J., and Bille, J. (1995): Typing *Listeria monocytogenes*, a comparison of random amplification of polymorphic DNA with 5 other methods. *Res. Microbiol.* 146, 35-49.
- Boye, M., Kamstrup, S. and Dalsgaard, K. (1991): Specific sequence amplification of bovine virus diarrhea virus (BVDV) and hog cholera virus and sequencing of BVDV nucleic acid. *Vet. Microbiol.* 29, 1-13.
- Boyle, D. B., Pye, A. D., Kocherhans, R., Adair, B. M., Vрати, S., and Both, G. W. (1994): Characterisation of Australian ovine adenovirus isolates. *Vet. Microbiol.* 41, 281-291.
- Brock, T. D. and Freeze, H. (1969): *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.* 98, 289-297.

- Brownstein, M. J., Carpten, J. D., and Smith, J. R. (1996): Modulation of non-templated nucleotide addition by *Taq* DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *BioTechniques* 20, 1004-1010.
- Canal, C. W., Hotzel, I., de Almeida, L. L., Roehle, P. M., and Masuda, A. (1996): Differentiation of classical swine fever virus from ruminant pestiviruses by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). *Vet. Microbiol.* 48, 373-379.
- Carrino, J. J. and Lee, H. H. (1995): Nucleic acid amplification methods. *J. Microbiol. Methods* 23, 3-20.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987): Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Chumakov, K. M. (1994): Reverse transcriptase can inhibit PCR and stimulate primer-dimer formation. *PCR Methods and Applications* 4, 62-64.
- Clyde, Jr. W. A., (1983). Growth inhibition tests. In: S. Razin and J. G. Tully (eds): *Methods in Mycoplasma* Vol. 1., Academic Press pp. 405-410.
- Corapi, W. V., Donis, R. O., and Dubovi, E. J. (1990): Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 51, 1388-1394.
- Csontos, L. (1967): Isolation of adenoviruses from geese. *Acta Vet. Hung.* 17, 217-219.
- Czifra, Gy., Tuboly, T., Sundquist, B. G., and Stipkovits, L. (1993): Monoclonal antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* membrane proteins. *Avian Dis.* 37, 689-696.
- Da Silva, N., Zardoya, R., Santurde, G., Solana, A., and Castro, J. M. (1995): Rapid and sensitive detection of the bovine viral diarrhoea virus genome in semen. *J. Virol. Methods* 55, 209-218.
- De Moerlooze, L., Lecomte, C., Brown-Schimmer, S., Schmetz, D., Guiot, C., Vandenberghe, D., Allaer, D., Rossius, M., Chappuis, G., Dina, D., Renard, A., and Martial, J.A.

- (1993): Nucleotide sequence of the bovine viral diarrhoea virus Osloss strain: comparison with related viruses and identification of specific DNA probes in the 5' untranslated region. *J. Gen. Virol.* 74, 1433-1438.
- Deng, R. and Brock, K. V. (1993): 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analysis. *Nucleic Acids Res.* 21, 1949-1957.
- Derbyshire, J. B. (1989): Porcine adenovirus. In: Pensaert, M. B. (ed.) *Virus Infections of Porcines. Virus Infections of Vertebrates 2.* Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, Chap. 5, 73-80.
- Derzsy, D. (1967): A viral disease of goslings. I. Epidemiological, clinical, pathological and aetiological studies. *Acta Vet. Hung.* 17, 443-448.
- Edwards, S., Moennig, V., and Wensvoort, G. (1991): The development of an international reference panel of monoclonal antibodies for the differentiation of hog cholera virus from other pestiviruses. *Vet. Microbiol.* 29, 101-108.
- Eeles, R. A., Warren, W., and Stamps, A. (1992): The PCR revolution. *Eur. J. Cancer* 28, 289-293.
- Elgadi, M., Rghei, N., and Haj-Ahmad, Y. (1993): Sequence and sequence analysis of E1 and pIX regions of the BAV-3 genome. *Intervirology* 36, 113-120.
- Entrican, G., Dand, A., and Nettleton, P. F. (1995): A double monoclonal antibody ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of viraemic cattle and sheep. *Vet. Microbiol.* 43, 65-74.
- Esford, L. E. and Haj-Ahmad, Y. (1994): Sequence analysis of the putative E3 region of bovine adenovirus type 2. *Intervirology* 37, 277-286.
- Fan, H. H., Kleven, S. H., Jackwood, M. W., Johansson, K.-E., Pettersson, B., and Levisohn, S. (1995): Species identification of avian mycoplasmas by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay. *Avian Dis.* 39, 398-407.

- Fernández, C., Mattsson, J.G., Bölske, G., Levisohn, S., and Johansson, K.-E. (1993): Species-specific oligonucleotide probes complementary to 16S rRNA of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. Res. Vet. Sci. 55, 130-136.
- Frey, M. L., Hanson, R. P., and Anderson, D. P. (1968): A medium for the isolation of avian mycoplasmas. Am. J. Vet. Res. 29, 2163-2171.
- Garcia, 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.
- Garwes, D. J. and Xuan, H. (1989): Genome typing of three serotypes of porcine adenoviruses. Intervirology 30, 234-236.
- 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.
- Gelehrter, T. A. and Collins, F. S. (eds., 1990): Principles of medical genetics. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 255-286.
- Gelfand, D. H. (1989): *Taq* DNA polymerase. In: Erlich, H., A. (ed.) PCR Technology: Principles and applications for DNA amplification. Stockton Press, New York, pp. 17-22.
- Gough, R. E., Spackman, D., and Collins, M. S. (1981): Isolation and characterisation of a parvovirus from goslings. Vet. Rec. 108, 399-400.
- Grau, O., Laigret, F., Carle, P., Tully, J. G., Rose, D. L., and Bové, J. M. (1991): Identification of a plant-derived mollicute as a strain of an avian pathogen, *Mycoplasma iowae*, and its implications for mollicute taxonomy. Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 473-478.

- Grieser-Wilke, I., Haas, L., Dittmar, K., Liess, B., and Moennig, V. (1993): RNA insertions and gene duplications in the nonstructural protein p125 region of pestivirus strains and isolates *in vitro* and *in vivo*. *Virology* 193, 977-980.
- Harrach, B., Meehan, B. M., Benkő, M., Adair, B. M., and Todd, D. (1997): Close genetic relationship between egg drop syndrome virus, bovine adenovirus serotype 7, and ovine adenovirus strain 287. *Virology* 229, 302-306.
- Harrach, B. and Benkő, M.: Phylogenetic analysis of adenovirus sequences; proof of necessity of establishing a third genus in the Adenoviridae family; In: Wold, W. S. M. (ed.) *Adenovirus Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ, Humana Press (in press)
- Hamel, A. L., Wasylyshen, M. D., and Nayar, G. S. (1995): Rapid detection of bovine viral diarrhea virus by using RNA extracted directly from assorted specimens and a one-tube reverse transcription PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 33, 287-291.
- Harasawa, R. (1996): Phylogenetic analysis of pestivirus based on the 5'-untranslated region. *Acta virologica* 40, 49-54.
- Harasawa, R. and Tomiyama, T. (1994): Evidence of pestivirus RNA in human virus vaccines. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1604-1605.
- Harasawa, R., Tohya, Y., Yoshida, M., Kataoka, Y., and Katae, H. (1994): Two genomic variations in the E1 region of canine adenovirus type 2 strains. *Vet. Microbiol.* 40, 373-378.
- Hengen, P. N. (1994): Long and accurate PCR. *Trends in Biochemical Science* 19, 341.
- Hertig, C., Pauli, U., Zanoni, R., and Peterhans, E. (1991): Detection of bovine viral diarrhea (BVD) virus using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 26, 65-76.

- Higuchi, R. (1989a): Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: Erlich, H., A. (ed.) PCR Technology: Principles and applications for DNA amplification. Stockton Press, New York, pp. 31-38.
- Higuchi, R. (1989b): Using PCR to engineer DNA. In: Erlich, H., A. (ed.) PCR Technology: Principles and applications for DNA amplification. Stockton Press, New York, pp. 61-70.
- Hiltunen, T., Raja-Honkala, M., Nikkari, T., and Ylä-Herttuala, S. (1994): A PCR artifact under low-stringency conditions due to amplification by only one primer. *BioTechniques* 17, 240-242.
- Hinnisdaels, S., Del-Favero, J., and Vauterin, M. (1996): Direct cloning of PCR products amplified with Pwo DNA polymerase. *BioTechniques* 20, 186-188.
- Hirahara, T., Yashura, H., Matsui, O., Yamanaka, M., Tanaka, M., Fukuyama, S., Izumida, A., Yoshiki, K., Kodama, K., Nakai, M., and Sasaki, N. (1990): Isolation of porcine adenovirus from the respiratory tract of pigs in Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.* 52, 407-409.
- Hofmann, M. A., Brechtbühl, K., and Stäuber, N. (1994): Rapid characterization of new pestivirus strains by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5' noncoding region. *Arch. Virol.* 139, 217-229.
- Horner, G. W., Hunter, R., Bartha, A., and Benkő, M. (1989): A new subgroup 2 bovine adenovirus proposed as the prototype strain 10. *Arch. Virol.* 109, 121-124.
- Horner, G. W., Tham, K.-M., Orr, D., Ralston, J., Rowe, S., and Houghton, T. (1995): Comparison of an antigen capture enzyme-linked assay with reverse transcription - polymerase chain reaction and cell culture immunoperoxidase tests for the diagnosis of ruminant pestivirus infections. *Vet. Microbiol.* 43, 75-84.
- Hu, S.-L., Battles, J. K., and Potts, D. E. (1984b): Restriction analysis and homology studies of bovine adenovirus 7 genome. *J. Virol.* 51, 880-883.

- Hu, S.-L., Hays, W. W., and Potts, D. E. (1984a): Sequence homology between bovine and human adenoviruses. *J. Virol.* 49, 604-608.
- Innis, M. A. and Gelfand, D. H., (1990): Optimization of PCRs. In: PCR protocols: A guide to methods and applications. Innis, M. a., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. Ed., Academic Press, San Diego, CA. pp. 13-20.
- Jefferey, S. B., 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.
- Johansson, K.-E. (1993): Detection and identification of mycoplasmas with diagnostic DNA probes complementary to ribosomal RNA. In, I. Kahane and A. Adoni (Editors), *Rapid Diagnosis of Mycoplasmas*, Plenum Press, New York, pp. 139-154.
- Jordan, F. T. W. (1983): Recovery and identification of avian mycoplasmas. In, S. Razin and J. G. Tully (Editors), *Methods in Mycoplasmaology*, Vol. 2., Academic Press, pp. 69-79.
- Kaszanyitzky, É., Czifra, G., and Stipkovits, L. (1994): Detection of *Mycoplasma gallisepticum* antibodies in turkey blood samples by ELISA and by the slide agglutination and haemagglutination inhibition tests. *Acta Vet. Hung.* 42, 69-78.
- Katz, J. B., Ridpath, J., and Bolin, S. R. (1993): Presumptive diagnostic differentiation of hog cholera virus from bovine viral diarrhea and border disease viruses by using a cDNA nested-amplification approach. *J. Clin. Microbiol.* 31, 565-568.
- Kawasaki, E. S. (1990): Amplification of RNA. In: PCR protocols: A guide to methods and applications. Innis, M. a., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. (eds.) Academic Press, San Diego, CA. pp. 21-27.
- Kecskeméti, S., Kisary, J., Pálfi, V., Bacsó, T., Bistyák, A., Hortobágyi, E., és Kiss, I., (1996): A Derzsy-féle betegség diagnosztikája. Derzsy nap, Budapest, szeptember 19.

- Kelly, W. R. (1993): The liver and biliary system. In: Jubb, P., Kennedy, C. and Palmer, N. (eds.) Pathology of Domestic Animals. 4th Ed. Vol 2. K. V. F. Academic Press, San Diego, pp. 364-366.
- Khan, M. I., Lam, K. M., and Yamamoto, R. (1987): *Mycoplasma gallisepticum* strain variations detected by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Avian Dis. 31, 315-320.
- King, A. A. and Harkness, J. W. (1975): Viral contamination of fetal bovine serum. Vet. Rec. 97, 16.
- Kisary, J., Derzsy, D., and Mészáros, J. (1978): Attenuation of the goose parvovirus strain B. Laboratory and field trials of the attenuated mutant for vaccination against Derzsy's disease. Avian Pathol. 7, 397-406.
- Kisary, J. (1993): Derzsy's disease of geese. In: J. B. McFerran and M. S. McNulty (Eds.), Virus infection of birds, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 157-162.
- Kiss, I., Matiz, K., Allard, A., Wadell, G., and Benkő, M. (1996a): Detection of homologous DNA sequences in animal adenoviruses by polymerase chain reaction. Acta Vet. Hung. 44, 243-251.
- Kiss, I., Matiz, K., Bajmócy, E., Rusvai, M., and Harrach, B. (1996b): Infectious canine hepatitis: detection of canine adenovirus type 1 by polymerase chain reaction. Acta Vet. Hung. 44, 253-258.
- Kiss, I., Matiz, K., Kaszanyitzky, E., Chavez, Y., and Johansson, K.-E. (1997): Detection and identification of avian pathogen mycoplasmas by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay. Vet. Microbiol. (in press)
- Kiss, I., Matiz, K., Kecskeméti, S., és Tanyi, J. (1997): A PCR alkalmazásával nyert tapasztalatok a Debreceni Állat-egészségügyi Intézetben. Magy. Áov. Lapja, 119, 556-558.

- Kleiboeker, S. B., Seal, B. S., and Mengeling W. L. (1993): Genomic cloning and restriction site mapping of a porcine adenovirus isolate: demonstration of genetic stability in porcine adenovirus. *Arch. Virol.* 133, 357-368.
- Kleven, S. H., Morrow, C. J., and Whithear, K. J. (1988): Comparison of *Mycoplasma gallisepticum* strains by hemagglutination-inhibition and restriction endonuclease analysis. *Avian Dis.* 32, 731-741.
- Kobs, G. (1997): Cloning blunt-end DNA fragments into the pGEM-T vector systems. *Promega Notes* 62, 15-19.
- Kurokawa, T., Igarashi, K., and Sugino, Y. (1978): Biochemical studies on bovine adenovirus type 3 III. Cleavage maps of viral DNA by restriction endonucleases *EcoRI*, *BamHI* and *HindIII*. *J. Virol.* 28, 212-218.
- Lakatos, B., Farkas, J., Egberink, H. F., Vennema, H., Horzinek, M. C., van Vliet, A., Rossen, J., Benkő, M., és Ongrádi, J. (1997): Adenovírus kimutatása macskából PCR módszerrel. *Magy. Áov. Lapja*, 119, 517-519.
- Løken, T., Krogsrud, J., and Bjerkas, I. (1991): Outbreaks of border disease in goats induced by a pestivirus-contaminated orf vaccine, with virus transmission to sheep and cattle. *J. Comp. Path.* 104, 195-209.
- Lauerman, L. H., Hoerr, F. J., Sharpton, A. R., Shah, M. S., and van Santen, V. L. (1993a): Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.* 37, 829-834.
- Lauerman, L. H., Shah, M. S., Williams, J. C., Corsiglia, C. M., and Herring, R. J. (1993b): Immunoglobulin receptors used in avian mycoplasma identification. *Avian Dis.* 37, 1080-1084.
- Lazar, J. G. (1994): Advanced methods in PCR product detection. *PCR Methods and Applications. Manual Supplement.* 4, 1-14.

- Le, S.-Y., Sonenberg, N., and Maizel, J.V. jr. (1995): Unusual folding regions and ribosome landing pad within hepatitis C virus and pestivirus RNAs. *Gene* 154, 137-143.
- Ley, D. H. and Avakian, A. P. (1992): An outbreak of *Mycoplasma synoviae* infection in North Carolina turkeys, comparison of isolates by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and restriction endonuclease analysis. *Avian Dis.* 36, 672-678.
- Liedtke, W., Battistini, L., Brosnan, C. F., and Raine, C. S. (1994): A comparison of methods for RNA extraction from lymphocytes for RT-PCR. *PCR Methods and Applications* 4: 185-187.
- Limn, C., Yamada, T., Nakamura, M., and Takehara, K. (1996): Detection of Goose parvovirus genome by polymerase chain reaction: distribution of Goose parvovirus in Muscovy ducklings. *Virus Res.* 42, 162-172.
- Linquist, V., Stoddart, C. A., and McCune J. M. (1998): UV irradiation of polystyrene pipets releases PCR inhibitors. *BioTechniques*, 24, 50-52.
- Lowe, T., Sharefkin, J., Yang, S. Q., and Dieffenbach, C. W. (1990): A computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reactions. *Nucleic Acids Res* 18,1757-1761.
- Lowings, J. P., Paton, D. J., Sands, J. J., De Mia, G. M., and Rutili, D. (1994): Classical swine fever: genetic detection and analysis of differences between virus isolates. *J. Gen. Virol.* 75, 3461-3468.
- Luo, G., An, G., and Wu, R. (1994): A PCR differential screening method for rapid isolation of clones from a cDNA library. *BioTechniques* 16, 670-675.
- Macháty, Z., Páldi, A., Csáki, T., Varga, Zs., Kiss, I., Bárándi, Zs., and Vajta, G. (1993): Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 98, 467-470.
- Matiz, K. (1997): Új, patogén adenovírus szarvasmarhákban, a BAV-10? *Magy. Áov. Lapja*, 119, 140-142.

- Matiz, K., Ursu, K., Harrach, B., Zádori, Z., and Benkő, M.: Sequencing and phylogenetic analysis of the protease gene, and genetic mapping of bovine adenovirus type 10 define its relatedness to other bovine adenoviruses. benyújtva: Virus Research.
- Meinkoth, J. and Wahl, G. (1984): Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. Anal. Biochem. 138, 267-284.
- Mészáros, J. (1985): A liba Derzsy-féle betegsége. Szent-Iványi, T. és Mészáros, J. (szerk.) A háziállatok fertőző betegségei. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 317-321.
- Meyers, G., Tautz, N., Dubovi, E. J., and Thiel, H.-J. (1991): Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. Virology, 180, 602-616.
- Miller, K. and Storts, D. R. (1995): A sensitive single-tube, two-enzyme system for RT-PCR. Promega Notes 53, 2 -5.
- Mittal, S. K., Prevec, L., Babiuk, L. A., and Graham, F. L. (1992): Sequence analysis of bovine adenovirus type 3 early regions and fibre protein genes. J. Gen. Virol. 73, 3295-3300.
- Montpetit, M. L., Cassol, S., Salas, T., and O'Shaughnessy, M. V. (1992): OLIGSCAN: a computer program to assist in the design of PCR primers homologous to multiple DNA sequences. J. Virol. Methods. 36, 119-128.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155, 335-350.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Horn, G. T., and Erlich, H. A. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51, 263-273.
- 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.
- Nuovo, G. J. (1995): In situ PCR: protocols and applications. PCR Methods and Applications, Manual Supplement. 4, 151-167.

- Oefner, P. J., Huber, C. G., Puchhammer-Stöckl, E., Umlauf, F., Grünwald, K., Bonn, G. K., and Kunz, C. (1994): High-performance liquid chromatography for routine analysis of hepatitis C virus cDNA/PCR products. *BioTechniques* 16, 898-908.
- Paton, D. J. (1995): Pestivirus diversity. *J. Comp. Pathol.* 112, 215-236.
- Paton, D. J., Sands, J. J., Lowings, J. P., Smith, J. E., Ibata, G., and Edwards, S. (1995): A proposed division of the pestivirus genus using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralisation assays and genetic sequencing. *Vet. Res.* 26, 92-109.
- Paton, D. J., Simpson, V., and Done, S. H. (1992): Infections of pigs and cattle with bovine viral diarrhoea virus on a farm in England. *Vet. Rec.* 131, 185 -188.
- Pellerin, C., Van Den Hurk, J., Lecomte, J., and Tijssen, P. (1994): Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 203, 260-268.
- Pettersson, B., Johansson, K.-E., and Uhlén, M. (1994): Sequence analysis of 16S rRNA from mycoplasmas by direct solid-phase DNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2456-2461.
- Pfeffer, U., Fecarotta, E., and Vidali, G. (1995): Efficient one-tube RT-PCR amplification of rare transcripts using short sequence-specific reverse transcription primers. *BioTechniques*, 18, 204-206.
- Poole, T. L., Wang, C., Popp, R. A., Potgieter, L. N. D., Siddiqui, A., and Collett, M. S. (1995): Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology* 206, 750-754.
- Radwan, G. S., Brock, K. V., Hogan, J. S., and Smith, K. L. (1995): Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhea virus. *Vet. Microbiol.* 44, 77-92.

- Rashtchian, A. (1994): Amplification of RNA. PCR Methods and Applications, Manual Supplement. 4, 83-91.
- Reddy, S. P., Nagy, É., and Derbyshire, B. J. (1993): Restriction endonuclease analysis and molecular cloning of porcine adenovirus type 3. Intervirology 36, 161-168.
- Reddy, S. P., Tuboly, T., Nagy, É., and Derbyshire, B. J. (1995): Molecular cloning and physical mapping of porcine adenovirus types 1 and 2. Arch. Virol. 140, 195-200.
- Reeben, M. and Prydz, H. (1994): An improved method for detection of 5-methyl-cytosine by PCR-based genomic sequencing. BioTechniques 16, 416-417.
- Rhoades, K. R., Phillips, M., and Yoder, Jr. H. W. (1974): Comparison of strains of *Mycoplasma gallisepticum* by polyacrylamide gel electrophoresis. Avian Dis. 18, 91-96.
- Ridpath, J. F., Bolin, S. R., and Katz, J. (1993): Comparison of nucleic acid hybridization and nucleic acid amplification using conserved sequences from the 5' noncoding region for detection of bovine viral diarrhea virus. J. Clin. Microbiol. 31, 986-989.
- Roberts, M. M., White, J. L., Grütter, M. G., and Burnett, R. M. (1986): Three-dimensional structure of the adenovirus major coat protein hexon. Science 232, 1148-1151.
- Ros Bascuñana, C., Mattsson, J.G., Bölske, G., and Johansson, K.-E. (1994): Characterization of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma* sp. strain F38 and development of an identification system based on PCR. J. Bacteriol. 176, 2577-2586.
- Roszkowski, J., Gazdzinski, PCR., Kozaczynski, W., and Bartoszcze, M. (1982): Application of the immunoperoxidase technique for the detection of Derzsy's disease virus antigen in cell culture and goslings. Avian Pathol. 11, 571-578.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K.B., and Erlich, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487-491.

- Saiki, R. K., (1990): Amplification of genomic DNA. In: PCR protocols: A guide to methods and applications. Innis, M. a., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. (eds.) Academic Press, San Diego, CA. pp. 13-20.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N., (1985): Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Saiki, R.K. (1989): The design and optimization of the PCR. In: Erlich, H., A. (ed.) PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. Stockton Press, New York, pp. 7-16.
- Salmon, K. and Haj-Ahmad, Y. (1994): Sequence analysis bovine adenovirus type 2 early region and pIX gene. *Intervirolgy* 37, 298-305.
- Sarkar, G., Kapelner, S., and Sommer, S. S., (1990): Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Res.* 18, 7465.
- Scamrov, A. and Beabealashvilli, R. (1991): *Mycoplasma gallisepticum* strain S6 genome contains three regions hybridizing with 16S rRNA and two regions hybridizing with 23S and 5S rRNA. *FEBS Lett.* 291, 71-74.
- Schlegel, J., Vogt, T., Munkel, K., and Rüschoff, J. (1996): DNA fingerprinting of mammalian cell lines using nonradioactive arbitrarily primed PCR (AP-PCR). *BioTechniques* 20, 178-180.
- Schmitt, B. J., Lopez, O. J., Ridpath, J. F., Galeota-Wheeler, J., and Osorio, F. A. (1994): Evaluation of PCR for diagnosis of bovine viral diarrhea virus in tissue homogenates. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 44-47.
- Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F., and Zeillinger, R. (1995): Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods and Applications* 4, 234-238.

- Selvakumar, N., Ding, B.-C., and Wilson, S. M. (1997): Separation of DNA strands facilitates detection of point mutations by PCR-SSCP. *BioTechniques* 22, 604-606.
- Slavik, M. F., Wang, R.-F., and Cao, W.-W. (1993): Development and evaluation of the polymerase chain reaction method for diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Mol. Cell. Probes* 7, 459-463.
- Smith, L. S., Lewis, T. L., and Matsui, S. M. (1995): Increased yield of small DNA fragments purified by silica binding. *BioTechniques* 18, 970-975.
- Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Stipkovits, L., Czifra, Gy., and Sundquist, B. G. (1993): Indirect ELISA for detection of specific antibody response against *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Pathol.* 22, 481-494.
- Stock, C., White, D., and Golumbeski, G. (1995): Properties of *Taq* DNA polymerase purified by various methods. *Promega Notes* 51, 2-9.
- Sugden, B. (1993): How some retroviruses got their oncogenes. *Trends in Biochemical Sciences* 18, 233-235.
- Suggs, S. V., Hirose, T., Myake, E. H., Kawashima, M. J., Johnson, K. I. and Wallace, R. B. (1981): ICN-UCLA symposium for developmental biology using purified gene. (Brown, D. D., ed.), vol. 23, pp. 683-693. Academic Press, New York.
- Sullivan, D. G. and Akkina, R. K. (1995): A nested polymerase chain reaction assay to differentiate pestiviruses. *Virus Res.* 38, 231-239.
- Szent-Iványi, T. (1985): Adenovirusok okozta betegségek. Szent-Iványi, T. és Mészáros, J. (szerk.) *A háziállatok fertőző betegségei. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest*, 324-333.
- Takehara, K., Hyakutake, K., Imamura, T., Mutoh, K., and Yoshimura, M. (1994): Isolation, identification and plaque titration of parvovirus from Muscovy ducks in Japan. *Avian Dis.* 38, 810-815.

- Talkington, F. D. and Kleven, S. H. (1983): A classification of laboratory strains of avian mycoplasma serotypes by direct immunofluorescence. *Avian Dis.* 27, 422-429.
- Temesgen, B. and Eschrich, K. (1996): Simplified method for ligase-free cloning of PCR products. *BioTechniques* 21, 828-832.
- Terpstra, C. and Wensvoort, G. (1988): Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. *Res. Vet. Sci.* 45, 137-142.
- Thomas, C. B. and Sharp, P. (1988): Detection of antigenic variation among strains of *Mycoplasma gallisepticum* by enzyme-linked immunosorbent inhibition assay (ELISIA) and Western blot analysis. *Avian Dis.* 32, 748-756.
- Timme, T. L. and Thompson, T. C. (1994): Rapid allotype analysis of p53 knockout mice. *BioTechniques* 17, 460-463.
- Toogood, C. I. A. and Hay, R. T. (1988): DNA sequence of the adenovirus type 41 hexon gene and predicted structure of the protein. *J. Gen. Virol.* 69, 2291-2301.
- Tuboly, T., Reddy, S. P., Nagy, É., and Derbyshire, B. J. (1995): Restriction endonuclease analysis and physical mapping of the genome of porcine adenovirus type 5. *Virus Res.* 37, 49-54.
- Van Kuppeveld, F. J. M., Van Der Logt, J. T. M., Angulo, A. F., Van Zoest, M. J., Quint, W. G. V., Niesters, H. G. M., Galama, J. M. D., and Melchers, W. J. G. (1992): Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2606-2615.
- Van Oirschot, J.T. (1988) Description of the virus infection. In: B. Liess (ed.), *Classical swine fever and related viral infections*. Martinus Nijhoff, Boston, pp. 1-25.
- Vilček, S., Herring, A. J., Herring, J. A., Nettleton, P. F., Lowings, J. P., and Paton, D. J. (1994): Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least

- three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. Arch. Virol. 136, 309-323.
- von Beroldingen, C. H., Blake, E. T., Higuchi, R., Sensabaugh, G. F., and Erlich, H. (1989): Applications of PCR to the analysis of biological evidence. In: Erlich, H., A. (ed.) PCR Technology: Principles and applications for DNA amplification. Stockton Press, New York, pp. 61-70.
- Weisburg, W. G., Tully, J. G., Rose, D. L., Petzel, J. P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T. G., van Etten, J. L., Maniloff, J., and Woese, C. R. (1989): A phylogenetic analysis of the mycoplasmas, basis for their classification. J. Bacteriol. 171, 6455-6467.
- Welch, H. M., Bridges, C. G., Lyon, A. M., Griffiths, L., and Edington, N. (1992): Latent equid herpesvirus 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. J. Gen. Virol. 73, 261-268.
- Wensvoort, G. and Terpstra, C. (1988): Bovine viral diarrhoea infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine. Res. Vet. Sci. 45, 143-148.
- Wensvoort, G., Bloemraad, M., and Terpstra, C. (1988): An enzyme immunoassay employing monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies to classical swine fever virus. Vet. Microbiol. 17, 129-140.
- Westermeier, R. (ed., 1993): Electrophoresis in practice. VCH, Weinheim, pp. 5-33.
- Wirz, B., Tratschin, J.-D., Müller, H. K., and Mitchell, D. B. (1993): Detection of hog cholera virus and differentiation of other pestiviruses by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 31, 1148-1154.
- Yogev, D., Levisohn, S., Kleven, S. H., Halachmi, D., and Razin, S. (1988): Ribosomal RNA gene probes to detect intraspecies heterogeneity in *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae*. Avian Dis. 32, 220-231.

- Zádori, Z., Stefancsik, R., Rauch, T., and Kisary, J. (1995): Analysis of the complete nucleotide sequences of goose and Muscovy duck parvoviruses indicates common ancestral origin with adeno-associated virus 2. *Virology* 212, 562-573.
- Zhao, S. and Yamamoto, R. (1993): Detection of *Mycoplasma meleagridis* by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 36, 91-97.
- Zimmermann, K, Schögl, D., Plaimauer, B., and Mannhalter, J. W. (1996): Quantitative multiple competitive PCR of HIV-1 DNA in a single reaction tube. *BioTechniques* 21, 52-56.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Harrach Balázsnak, aki egyfajta szemléletet adott a molekuláris virológiához, és felkeltette érdeklődésemet a téma iránt. Nélkülözhetetlen segítséget kaptam tőle a módszerek elsajátításához, és a munka során született cikkek megírásához. Ötleteivel - melyekre remélem, a jövőben is támaszkodhatok - rendre újabb és újabb alkalmazási lehetőségekre hívta fel a figyelmem. Hálával és szeretettel gondolok Dr. Benkő Máriára, aki értékes gyakorlati tanácsaival, valamint szigorú kritikai észrevételeivel segített a kísérletek összeállításában, és tanulmányaim során, valamint emberi problémáimban végig mellettem állt. A munka elvégzéséhez nagyban hozzájárult az általa kialakított közvetlen, baráti légkör, mely mindvégig jó hatással volt a laborban dolgozók teljesítményére.

Köszönettel tartozom Dr. Tanyi Jánosnak, a Debreceni Állategészségügyi Intézet igazgatójának, amiért lehetővé tette számomra a részvételt az egyetemi doktori képzésben, és biztosította egy új, nagy jelentőségű technika rutindiagnosztikai bevezetésének egyedülálló lehetőségét. Tanyi doktor nagy segítséget nyújtott a különböző hazai ill. külföldi szakmai fórumokon való részvételben is. Köszönetet mondok intézeti állatorvos munkatársaimnak, akik a mintagyűjtéssel, a minták feldolgozásával, értékes tanácsaikkal, valamint saját demonstrációs anyagaikkal segítették a kísérletek kivitelezését, azok előadásokon történő bemutatását.

Dr. Solti Lászlónak köszönöm a cikkek kéziratának bírálatát, valamint a vezetése alatt a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban a kísérletes munkák során szerzett, és a jelen dolgozat megírása során felhasznált tapasztalatokat.

Köszönettel tartozom Dr. Nagy Bélának, az MTA Állatorvostudományi Kutatóintézete igazgatójának, valamint a Földművelésügyi Minisztériumnak, amiért lehetővé tették részvételemet különböző, a módszerek elsajátításához nagyban hozzájáruló, a FAO által szervezett külföldi és hazai továbbképzéseken.

Etienne Thiry professzornak azt a 3 hónapot köszönöm, amit laboratóriumában, a Liegei Egyetem Állatorvosi Fakultásának Virologia-Immunológia Tanszékén töltöttem el, s ahol tovább fejleszthettem módszertani ismereteimet.

Dr. Tuboly Tamás (MTA Állatorvostudományi Kutatóintézete) a cikkek kéziratának szigorú bírálatával és hasznos tanácsaival, valamint a PAV-5 tisztított DNS-ével járult hozzá a munka kivitelezéséhez, amit ezúton is nagyon köszönök neki.

Köszönöm Dr. Karl-Erik Johanssonnak (Svéd Nemzeti Állategészségügyi Intézet Bakteriológiai Osztály, Uppsala, Svédország), hogy a mycoplasmákkal kapcsolatos kísérletekhez, valamint az azokból született cikkhez aprólékos, mind szakmai, mind stilisztikai szempontból nagyon tanulságos bírálatokkal, megjegyzésekkel járult hozzá.

Dr. Kisary Jánosnak és Tóth Károlynak (Rekombivet Kft., Budapest) a Derzsy-féle betegség PCR-es diagnosztikájához nyújtott szakmai segítségéért mondok köszönetet.

Dr. Zádori Zoltán (MTA Állatorvostudományi Kutatóintézete) és Ursu Krisztina (Országos Állategészségügyi Intézet) az előadásokra való felkészülésben valamint a cikkek összeállításában nyújtottak értékes segítséget.

A Debreceni Állategészségügyi Intézet Virologiai Osztálya asszisztenseinek külön köszönöm a minták előkészítésében, valamint a kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségét.

A munka elvégzéséhez anyagi támogatást nyújtottak a Nemzeti Kutatási Alap következő pályázatait: OTKA I/3 1984, I/7 T016882, A312 és C0043. Az adenovírusos kísérleteket a Svéd Királyi Akadémia is támogatta. A Liegei Egyetemen töltött tanulmányi utamra a TEMPUS szervezésében került sor.

Az értekezésben felhasznált saját közlemények

- Kiss, I., Matiz, K., Bajmócy, E., Rusvai, M., and Harrach, B. (1996): Infectious canine hepatitis: detection of canine adenovirus type 1 by polymerase chain reaction.**
Acta Veterinaria Hungarica 44, 253-258.
- Kiss, I., Matiz, K., Allard, A., Wadell, G., and Benkő, M. (1996): Detection of homologous DNA sequences in animal adenoviruses by polymerase chain reaction.**
Acta Veterinaria Hungarica 44, 243-251.
- Kiss, I., Matiz, K., Kaszanyitzky, E., Chavez, Y., and Johansson, K.-E. (1997): Detection and identification of avian pathogen mycoplasmas by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay.**
Vet. Microbiol. 58, 23-30.
- Kiss, I., Matiz, K., Kecskeméti, S., és Tanyi, J. (1997): A PCR alkalmazásával nyert tapasztalatok a Debreceni Állat-egészségügyi Intézetben.**
Magy. Áov. Lapja, 119, 556-558.

Egyéb, az értekezésben fel nem használt közlemények

- Kiss, I. és Kecskeméti, S.: Újabb ismeretek a szarvasmarhák vírusos hasmenésének kórokozójáról. Irodalmi összefoglaló.**
Magy. Áov. Lapja, (közlésre elfogadva)
- Kecskeméti, S. és Kiss, I. (1998): A szarvasmarhák vírusos hasmenése. Irodalmi összefoglaló.**
Magy. Áov. Lapja, 120, 143-151.
- Kecskeméti, S. Kiss, I., és J., Tanyi (1998): A szarvasmarhák vírusos hasmenésének leküzdése. Irodalmi összefoglaló.**
Magy. Áov. Lapja, 120, 323-328.
- Macháty, Z., Páldi, A., Csáki, T., Varga, Zs., Kiss, I., Bárándi, Zs., and Vajta, G. (1993): Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos.**
J. Reprod. Fertil. 98, 467-470.
- Rudas, P., Papp, L., Huszenicza, Gy., Bartha, T., Berkényi, T. és Kiss, I. (1994): Gondolatok a kutya endokrin eredetű, szimmetrikus szőrhullásának megítéléséhez.**
Magy. Áov. Lapja, 12, 720-729.

