

**MADÁREREDETŰ MYCOPLASMA TÖRZSEK MOLEKULÁRIS
BIOLÓGIAI VIZSGÁLATA, VALAMINT A *MYCOPLASMA*
GALLISEPTICUM KIMUTATÁSA DNS-PRÓBÁVAL.**

PhD. értekezés

1997.

Dr. Sántha Miklós

Készült az MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetében



**MADÁREREDETŰ MYCOPLASMA TÖRZSEK MOLEKULÁRIS
BIOLÓGIAI VIZSGÁLATA, VALAMINT A *MYCOPLASMA*
GALLISEPTICUM KIMUTATÁSA DNS-PRÓBÁVAL.**

PhD. értekezés

Készítette: Dr. Sántha Miklós

Témavezetők: Dr. Stipkovits László, MTA Állatorvostudományi

Kutatóintézet

és

Dr. Raskó István, MTA Szegedi Biológiai Központ, Genetikai Intézet.

Készült az MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetében,

1997-ben.

TARTALOMJEGYZÉK

Ph.D. értekezés

1. Bevezetés.....	1
2. Célkitűzések.....	3
3. Anyag és módszer.....	5
4. Eredmények és következtetések.....	7
5. Az eredmények újszerűsége.....	10
6. Az eredmények gyakorlati jelentősége.....	11
7. Az eredmények összefoglalása.....	11
8. Angolnyelvű összefoglaló.....	13
9. Irodalomjegyzék.....	21
A Ph.D. értekezés tárgyát képező közlemények listája.....	24
Előadások az értekezés témaköréből.....	25
További közlemények.....	25
A Ph.D. értekezés tárgyát képező közlemények.....	27

1. BEVEZETÉS

1.1. A mycoplasmákról általában.

A mycoplasmák - a vírusokhoz hasonlóan - nagyon elterjedtek az élővilágban. Ízeltlábúak, emlősállatok, madarak, valamint növények sejtjeinek felületén többnyire mint paraziták élőködnek, de a sejtekbe behatolni is képesek, ahol különféle citopathológiás elváltozásokat okozva sejtpusztulást idéznek elő (1).

A mycoplasmák tanulmányozását vonzóvá teheti az a tény, hogy ezek a legkisebb és legegyszerűbb procaryota élőlények, amelyek még önálló szaporodásra képesek. A mycoplasmák 150-300 nm átmérőjű, plazmamembránnal körülvett, sejtfal nélküli mikroorganizmusok, sejtjeikre a nagyfokú pleiomorfizmus jellemző. Folyadékkultúrában a coccoid alaktól a fonalas alakig sokféle formában előfordulnak, az elágazódó fonalak hasonlítanak a gombafonalakhoz, innen ered elnevezésük is (2).

Biokémiaiilag a mycoplasmák két nagy csoportra oszthatók aszerint, hogy energiájukat milyen forrásból biztosítják: glukózbontókra és arginin felhasználókra (2).

A mycoplasmák mindössze kb. 500 MDa nagyságú genommal rendelkeznek, amelynek kódoló kapacitása legfeljebb 700 különböző fehérje kódolására elegendő. DNS összetételük jellegzetessége az alacsony (25-34 mol%) G+C arány (3).

1.2. A mycoplasmosisok jelentősége.

Csaknem minden háziállatfajunk fertőződhet és megbetegedhet mycoplasmák által. A szarvasmarhák ragadós tüdőlobját a *M.mycoides var. mycoides*, a sertések enzootias pneumoniáját a *M.hyo pneumoniae* okozza. A baromfi *M.gallisepticum*, a pulyka *M.meleagridis* okozta fertőzőtsége

idült légzőszervi megbetegedéssel jár (chronic respiratory disease, CRD). Más esetekben a mycoplasmák a nemi szervekben telepsznek meg és így szaporodási zavarokat, súlyosabb esetekben terméketlenséget okoznak (pl. a *M.cloacale* pulykában és libában). A fertőzöttség az állományokban sexuális úton rohamosan terjed. A kecskék és juhok járványos elapasztását a *M.agalactiae* okozza (4).

A humán mycoplasmás megbetegedések közül a *M. pneumoniae* által okozott atípusos pneumonia már aránylag régóta ismert (5,6), a termékenység zavarokat és meddőséget létrehozó *M. genitalium* csak az 1980-as évek közepén vált ismertté (7). A közelmúltban írtak le olyan mycoplasma törzseket (*M.fermentans*, *M.pirum*, *M.penetrans*), amelyek következetesen csak HIV szeropozitív illetve AIDS-es betegekből izolálhatók, ezért ezeket a törzseket a HIV vírus synergistáinak tartják (8). Tény, hogy a húgyúti fertőzésekben szerepet játszó *M.hominis*, *M.genitalium*, és *Ureoplasma urealyticum* törzsek, a hámsérülések előidézése, a gyulladásos állapot fentartása révén elősegíthetik a HIV vírus behatolását a szervezetbe. Az is bizonyított, hogy a szervezet tartós mycoplasmás fertőzöttsége T-sejt anergiát, azaz immunszupressziót eredményezhet, ami szintén segítheti a HIV fertőzöttség, illetve az AIDS kialakulását (8).

1.3. A *M. gallisepticum*.

A *Mycoplasma gallisepticum* a házityúk idült légzőszervi megbetegedésének (CRD), - mycoplasmosisának - kórokozója. Elsőként Nelson izolálta 1935-ben (9) és írta le, mint fertőző coccobacilliform testeket, majd Adler és mtsai. (1957) izoláltak és azonosítottak madár eredetű pleuropneumonia like organism (PPLO) - a mycoplasmák korábbi elnevezése - törzseket (10). A *M. gallisepticum* által okozott elváltozások

elsősorban idült jellegűek, a légcsővön, tüdön és a légzsákokon jelentkeznek, s a hosszantartó megbetegedés az állatok csökkent ellenállóképességéhez, rossz takarmány-értékesítéséhez, lesóványodásához és esetenként tömeges elhullásához vezet. Több esetben ízületi gyulladás (arthritis) kialakulását is megfigyelték (11,12). Ritkábban a kis artériák gyulladását (polyarteritis) okozza, amelynek során elsősorban az agy és a szív károsodik. Pulykákban a *M.gallisepticum* kifejezett tropizmust mutat az agy kis artériái iránt, és a létrejövő polyarteritist súlyos encephalopathia követi (13).

Porta és munkatársai szerint egyes európai országokban a tojóállományok *M.gallisepticum* fertőzöttsége közel 20%-os, de néhány közép- és keleteurópai országban eléri az 50 %-ot is (14). A *M.gallisepticum* okozta gazdasági kár világszerte szükségessé tette olyan program kidolgozását, amelynek célja a tojó és broiler állományok mycoplasma-mentesítése. Ilyen program hazánkban is elindult, de a kezdeti sikerek ellenére állományaink egy része továbbra is fertőzött maradt.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. Az MTA Állatorvostudományi Kutatóintézetében Stipkovits dr. és Varga Zsuzsanna dr.-nő szaporodási zavarokat és terméketlenséget mutató gúnárok phalluszából több mycoplasma törzset izolált. Mivel az előzetes vizsgálatok azt mutatták, hogy az izolált törzsek eddig nem leírt fajba tartozhatnak, célul tűztük ki, hogy az International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes előírásai szerint (15) **jellemezzük az izolált törzseket és új fajokként írjuk le.**

2.2. Mesterséges tojásfertőzéssel, **kísérletileg akartuk igazolni** azt az elméleti feltételezést, hogy az ún. keltetői fertőződés a *Mycoplasma gallisepticum*mal fertőzött tojásból kikelt naposcsibéktől eredő horizontális fertőződés következménye.

2.3. Különféle járványtani esetekből több *Mycoplasma gallisepticum* törzset izoláltak már, amelyek a betegség kiváltását előidézték. Ezek a törzsek felületi antigénjük alapján valamennyien egy fajhoz, a *Mycoplasma gallisepticum*hoz voltak besorolhatók, ugyanakkor pathogenitás tekintetében különböztek egymástól.

Az értekezés alapjául szolgáló kutatásoknak egyik meghatározó célja volt, hogy a baromfi mycoplasmosist okozó *Mycoplasma gallisepticum* fajon belüli törzseit, különböző izolátumait **molekuláris biológiai szempontból jellemezzük és összehasonlítsuk**. Ezek a vizsgálatok ma már elengedhetetlenek az izolált törzsek korszerű taxonómiai besorolása szempontjából (15). Fontosak azért is, mert lehetőséget nyújtanak a patogén mycoplasma törzsek terjedésének a nyomkövetésére DNS ujjlenyomataik (fingerprint) alapján, illetve egy adott telepen a fertőzöttség eredetének megállapítására (járványtani nyomozás).

2.4. A mycoplasma fertőzöttség kimutatására többféle módszert alkalmaznak. Az egyik a kórokozó mycoplasma faj közvetlen kitenyésztése a vizsgálati anyagból. Ez a módszer elvileg nagyon érzékeny (pár sejt már felneveszthető), de a mycoplasmák különleges tápanyagigényük miatt, csak speciális tápoldatban, aránylag hosszú idő alatt (5-10 nap) szaporíthatók fel. A tenyészet ezért gyakran más szaprofita mycoplasmákkal és baktériumokkal lehet szennyezett.

A mycoplasma ellenanyagszint megnövekedésének kimutatására hasznos diagnosztikai módszer a hemagglutinációs teszt, a hemagglutináció-gátlás, vagy a modernebb és érzékenyebb ELISA módszer. Ezek a próbák azonban csak akkor diagnosztikai értékűek, amennyiben a kéthetes időközben levett savópár-vizsgálat szignifikáns ellenanyagszint növekedést mutat. Ennek megfelelően a módszer rendkívül időigényes. Egyes esetekben keresztreakciók is előfordulhatnak (pl. a *M. synoviae*-val), amelyek megnehezítik a kiértékelést (16).

Ezek ismeretében célul tűztük ki, hogy **a baromfi mycoplasmás fertőzöttségének (mycoplasmosisának) kimutatására egy új, megbízható és gyors módszert dolgozzunk ki.**

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A vizsgált törzsek eredete.

A mesterséges tojásfertőzéshez a *M. gallisepticum* S6 Holland törzsét használtuk.

DNS hasítási és fehérje mintázat szempontjából hat, a világ különböző helyén, különböző járványtani eset során izolált *M. gallisepticum* törzset (X95, MK7, MS16, és három S6) vizsgáltunk meg és hasonlítottunk össze. Az S6 törzs három laboratóriumból (Hollandia, USA és Anglia/Bench) származott és a vizsgálatok során származási helytől függően külön-külön kezeltük azokat (5. közlemény, 1. táblázat).

A parciális genomikus génkönyvtár a *M. gallisepticum* S6 törzs DNS-ből készült.

Valamennyi madár-mycoplasma törzset BEG mediumban növesztettük (17).

3.2. Az alkalmazott vizsgálati módszerek:

3.2.1. Libából izolált mycoplasma törzsek azonosítása **szerológiai próbákkal** (1. és 2. közlemény, 18).

3.2.2. Liba eredetű mycoplasma törzsek **DNS G+C arányának meghatározása** olvadási pont alapján (19).

3.2.3. **Mesterséges embriófertőzés** *M. gallisepticum*mal, a kórokozó **visszaizolálása** a fertőzött szövetekből (3. és 4. közlemény).

3.2.4. A szöveti elváltozások **kórbonctani, kórszövettani és elektronmikroszkópos vizsgálata** (3. és 4. közlemény).

3.2.5. *Mycoplasma gallisepticum* törzsek fehérje mintázatainak összehasonlítása **SDS poliakrylamid gélelektroforezissel** (5. közlemény).

3.2.6. *Mycoplasma gallisepticum* törzsek **DNS fingerprintjének meghatározása** és összehasonlítása (5. közlemény).

3.2.7. A *Mycoplasma gallisepticum* S6 (Holland) törzs **részleges genomikus könyvtárának létrehozása** (6. közlemény).

3.2.8. Specifikus DNS próba szelektálása **dot és Southern hibridizációk** alapján (6. közlemény).

3.2.9. A próba érzékenységének meghatározása **dot hibridizációval** (6. közlemény).

3.2.10. A hibridizációs teszt egyszerűsítése, és a radioaktív próba biotinnal jelölt próbával történő helyettesítése, az ún. **direct filter hibridizációs (DFH) teszt adaptálása** (7. közlemény).

4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

4.1. A Dr. Varga Zsuzsanna által előzetesen elvégzett szerológiai és biokémiai vizsgálatok azt igazolták, hogy a Stipkovits laboratóriumban izolált négy (1219, 1220, 1221 és 1222 jelű) liba eredetű mycoplasma törzs közül három (az 1219, 1220 és 1222) nem azonos az eddig ismert madár és emlős mycoplasma törzsekkel. Előállítottuk az izolált törzsek elleni ellenanyagokat nyúlban, és növekedés gátlási próbával megállapítottuk, hogy az 1219 és 1222-es törzs szerológiailag egymással, az 1221-es törzs pedig a már korábban leírt *M. cloacale*-vel azonos (1. és 2. közlemény, 18,20).

Új mycoplasma törzsek leírása esetén a meghatározott biokémiai és szerológiai próbák elvégzésén kívül követelmény a fajok DNS G+C arányának meghatározása is. Ezt a törzsek DNS-olvadási pont meghatározásával végeztük el. Az 1219-es törzs DNS G+C aránya 28.55 mol%, az 1220-as törzsé 27.60 mol%, az 1221-es törzsé pedig 26.50 mol% (nem közölt adat). Ezek az alacsony DNS G+C arányok (26-29 mol%) bizonyítják, hogy a törzsek valóban mycoplasmák és nem antibiotikum hatásra kialakuló baktérium L-formák.

Ahhoz, hogy az izolált mycoplasma törzseket valóban új fajként írassuk le, a növekedés gátlási próbával kapott eredményeket más immunológiai módszerekkel (pl. immundiffúzió, anyagcsere gátlási próba) is meg kell erősíteni.

Azt, hogy a két, valószínűleg új mycoplasma-fajnak (1219/1222 és 1220) oktani szerepe lehet a tojólibák és gúnárok szaporodási zavarainak és terméketlenségének létrehozásában, mesterséges állatfertőzési kísérletek adatainak kell majd bizonyítania.

4.2. A *M. gallisepticum*mal végzett kísérletes csirkeembrió-fertőzés eredményei igazolták azt az elméleti feltételezésünket, hogy a keltetés során a tojásba került *M. gallisepticum* hatására az embrióknak csak egy bizonyos hányada hullik el, másrészüik viszont fertőzötten kikelhet és szerepet játszhat a keltetői horizontális fertőzés terjesztésében (3. és 4. közlemény).

Elektronmikroszkópos vizsgálattal sikerült kimutatni, hogy a mycoplasmák nemcsak extracellulárisan, hanem intracellulárisan is megtalálhatók, a légutak többnyire már elhalt hámsejtjeiben. Nem sikerült azonban választ adni arra a kérdésre, hogy az intracellulárisan kimutatható mycoplasmák vajon életképesek-e, hiszen a fertőzött szövetekből sikeresen visszaizolált mycoplasmák az extracelluláris térből is származhattak (3. és 4. közlemény).

4.3. Összehasonlítottuk a világ hat különböző pontjáról származó, baromfi mycoplasmosisból (CRD) izolált *Mycoplasma gallisepticum* törzs négy restriktív enzimmel (HindIII, BamHI, PstI, XhoI) nyert DNS hasítási mintázatát. Megállapítottuk, hogy a törzsek között genetikai polimorfizmus létezik és a vizsgált törzsek DNS hasítási mintázatuk alapján négy csoportba sorolhatóak (5. közlemény). A genetikai heterogenitást egy 800 bp. hosszú, klónozott *M. gallisepticum* génpróbával Southern hibridizációban is bizonyítani tudtuk (6. közlemény). A genetikai polimorfizmus a törzsek SDS- poliacrylamid gélelektroforezissel nyert fehérje mintázatában is tükröződött (5. közlemény).

A DNS ujjlenyomat vizsgálat jól reprodukálható és segítségével a törzsek nagy biztonsággal azonosíthatóak. Ez a módszer alkalmas arra, hogy segítségével a mycoplasma törzsek állományról-állományra történő terjedése nyomonkövethető legyen, illetve új (pathogenitás szempontjából eltérő)

törzsek behurcolása az állományba polgári peres bírósági eljárások során bizonyíthatóvá válják.

4.4. Az első nukleinsav hibridizáción alapuló mycoplasma kimutatások riboszómális RNS génpróbákkal történtek. Ezek a próbák azonban az *E.coli* homológ géneivel is reagáltak (21), illetve más, nem azonos fajba tartozó mycoplasma törzsekkel (22).

Taylor és munkatársai írtak le először fajspecifikus mycoplasma DNS próbát és használták sikerrel a *M. hyorhinis* kimutatására (23,24). A *M. pneumoniae* és a *M.genitalium* kimutatására Hyman és munkatársai alkalmaztak specifikus DNS próbát (25).

Ezen előzmények ismeretében hoztuk létre a *Mycoplasma gallisepticum* S6 Holland törzs részleges génkönyvtárát (6. közlemény), amelyből szelektáltunk egy olyan klónt, amelyet dot hibridizációban próbaként használva csak a baromfi mycoplasmosist okozó *M. gallisepticum* törzsek mutathatók ki, de a légutakban gyakran jelenlevő egyéb mycoplasmákkal (*M. pullorum*, *M. gallinaceum*, *M.gallopavonis*, *M. gallinarum*) a próba nem reagál és ugyancsak nincs keresztreakció más fakultatív patogén baktériumokkal (*E.coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebakterium*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum*) sem (6. közlemény).

Dot hibridizációval meghatároztuk a próba érzékenységét, 6 órás expozícióval 0.5 ng tisztított mycoplasma DNS-t tudunk kimutatni. Ennyi DNS-t kb. 5×10^4 mycoplasma sejt tartalmaz (6. közlemény).

A leírt próba ugyan nagymértékben specifikus és igen érzékeny, de a kimutatási reakció radioaktivitása miatt csak korlátozottan, erre engedéllyel rendelkező laboratóriumokban alkalmazható.

A svéd Nemzeti Állatorvosi Intézet Virologiai Osztályának munkatársai (Belák dr. és Linné dr) kifejlesztettek egy egyszerűsített DNS hibridizációs

eljárást, az ún. direkt filter hibridizációs (DFH) tesztet, amelynek lényege, hogy a klinikai mintából közvetlenül -DNS tisztítás nélkül-, biotinnal jelölt DNS próbával lehet a hibridizációt elvégezni (26). A vírusok kimutatására kifejlesztett módszert velük együttműködve alkalmaztuk a mycoplasmák kimutatására. A DHF teszt egyszerű, gyors és veszélytelen. Azt hogy a biotinnal jelölt mycoplasma DNS-próba megtartja nagymértékű specificitását bizonyítja, hogy nem hibridizál 34 más mycoplasma- és acholeplasma fajjal (7. közlemény).

A biotinnal jelölt próbával dot hibridizációval 9×10^4 mycoplasma sejt volt kimutatható (7. közlemény).

A *M. gallisepticum* DNS próbával történő kimutatásának két előnye van a szerológiai próbákkal szemben. Az egyik, hogy gyorsabb (1-2 napon belül eredmény szolgáltatható), a másik, hogy keresztreakciók nem fordulnak elő, azaz a *M. synoviae* okozta fertőzöttséget nem diagnosztizálhatjuk tévesen *M. gallisepticum* fertőzöttségnek, azaz baromfi mycoplasmosisnak.

5. AZ EREDMÉNYEK ÚJSZERŰSÉGE

5.1. Négy, libából izolált mycoplasma törzset jellemeztünk és írtunk le. Eredményeink azt mutatták, hogy a vizsgált négy törzs közül kettő valószínűleg új mycoplasma fajt képvisel.

5.2. Az elsők között mutattuk ki a világon, hogy *Mycoplasma gallisepticum* törzsek között fajon belüli genetikai polimorfizmus létezik.

5.3. A világon elsőként hoztunk létre *M. gallisepticum*-specifikus DNS próbát és használtuk a kórokozó kimutatására.

6. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI JELENTŐSÉGE

Kidolgoztunk egy új, DNS hibridizáción alapuló diagnosztikai vizsgálati módszert, amellyel a tyúkok mycoplasmás fertőzöttsége gyorsan és nagy biztonsággal kimutatható. A vizsgálati módszer előnye, hogy érzékeny (kb. 5×10^4 CFU mycoplasma kimutatására alkalmas), nagymértékben specifikus, azaz csak a specifikus mycoplasmosis előidézésében szerepet játszó *Mycoplasma gallisepticum* törzseket mutatja ki, míg más jelenlevő, de nem patogén mycoplasmák a próbával nem reagálnak és így nem is detektálhatóak. Mivel a radioaktívan jelölt próba rutindiagnosztikai laboratóriumokban nem, vagy csak korlátozottan alkalmazható, az eljárást módosítottuk és egy olyan ún. direkt filter hibridizációs módszert (DFH) dolgoztunk ki, amelyben a próbát biotinnal jelöltük meg.

Jelenleg folyamatban van a diagnosztikai eljárás továbbfejlesztése. A *M. gallisepticum* törzsek polimeráz láncreakcióval (PCR) történő kimutatásával a módszert még egyszerűbbé, gyorsabbá kívánjuk tenni úgy, hogy annak nagyfokú specifitása megmaradjon. Ez a módszer már alkalmas lehetne a mycoplasmás fertőzöttség rutin laboratóriumokban történő kimutatására is.

7. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

7.1. Szaporodási zavarokat mutató gúnárokból négy mycoplasma törzset izoláltunk és jellemeztünk. Eredményeink szerint, a vizsgált törzsek közül kettő valószínűleg új mycoplasma-faj.

7.2. A *M. gallisepticum*mal végzett kísérletes csirkeembrió-fertőzés eredményei igazolták azt az elméleti feltételezésünket, hogy a keltetés során a tojásba került *M. gallisepticum* hatására az embrióknak csak egy bizonyos hányada hullik el, másrészük viszont fertőzötten kikelhet és szerepet játszhat a keltetői horizontális fertőzés terjesztésében.

7.3. Összehasonlítottuk hat, különböző helyen izolált *Mycoplasma gallisepticum* törzs SDS-poliacrylamid gélelektroforézissel nyert fehérje mintázatát és DNS ujjlenyomatát (fingerprintjét). Megállapítottuk, hogy a törzsek között fajon belüli genetikai heterogenitás létezik.

7.4. A tyúkok mycoplasmás fertőzöttségének kimutatására egy új, molekuláris alapokon nyugvó, gyors és specifikus módszert dolgoztunk ki.

8. MOLECULAR BIOLOGICAL ANALYSIS OF MYCOPLASMA STRAINS OF AVIAN ORIGIN, AND DETECTION OF *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* USING DNA PROBE.

INTRODUCTION

Mycoplasmas - similarly to the viruses- are widespread organisms in the nature, they are the most prevalent parasites of arthropods, animals , birds and plants. Mycoplasmas have the ability to invade and penetrate cells causing severe cytopathological effects and cell death.

Mycoplasmas are the smallest, simplest , self-replicating procaryotes, 150-300 nm in diameter, bounded by cell membrane, lacking cell-wall. Mycoplasma cells are highly pleiomorphic, ranging from coccoid to filamentous, with a pronounced tendency of the filaments to form branching structures resembling filamentous fungies.

They are biochemically divided in two main groups depending on their source of energy: glucose splitting and arginine utilising strains.

The genome of mycoplasmas is the smallest (500 MDa), recorded in living cells. Their coding capacity is less than 700 proteins, which is twice the number of proteins essential for the functioning of the smallest hypothetical cell, as was calculated according to the conventional results of molecular biology. The main characteristic of their DNA base composition is the very low G+C ratio.

Mycoplasma gallisepticum is the etiological agent of chronic respiratory diseases (CRD) in chickens. It was first isolated by Nelson et al. (1935) and described as an infectious coccobacilloform body. Later Adler et al. (1957) isolated pleuropneumonia like organism (PPLO) of avian origin.

The clinical symptoms caused by *M. gallisepticum* are mostly restricted to the respiratory organs, widespread lesions can be found in the trachea, lung and airsacs. During the chronic disease course, animals continuously loose weight and resistancy against conventional pathogens, such as *E. coli*.

RESEARCH GOALS

Several mycoplasma strains were isolated by Drs. Stipkovits and Varga (Veterinary Research Institute, Budapest) from cloaca and phallus of goose, from flocks affected by reproductive failure and infertility. Preliminary experiments showed, that the isolated strains do not belong to any known mycoplasma species described so far, therefore we decided to **characterise these isolates** further, according to the requirements of the International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes, and attempt to **describe them as new mycoplasma species**.

We wanted to **confirm experimentally** the hypothesis, that *M. gallisepticum* entering the egg during incubation kills only some of the embryos and infected survivors may hatch and, as such, play a role in spreading infection.

Mycoplasma strains classified as *M. gallisepticum* based on immunological tests, exhibited marked differences in their pathogenecity.

One of the main interest of our studies was to **characterise and compare different isolates of *M. gallisepticum* strains using techniques of molecular biology**. These investigations became extremely important by today in terms of classification of different isolates. Moreover, DNA



fingerprint experiments serve as valuable tools for identification of mycoplasma strains and to follow their spreading.

Several methods are currently used to detect mycoplasma infections of domestic animals. Direct culturing of mycoplasmas from clinical materials in artificial medium is very sensitive, however very laborious and time consuming. Usually it takes 5-10 days and contamination of the samples with bacteria can occur. Conventional serological methods (hemagglutination, hemagglutination inhibition, and the more sensitive ELISA techniques) are indispensable in identification of mycoplasmas, but meaningful only if rising antibody titre is demonstrated, requiring the testing at least from two serum samples. This causes a serious delay in delivery of laboratory results to the physician. Another serious diagnostic problem is the serological cross-reaction of *M. gallisepticum* with *M. synoviae*.

We aimed to develop a simple, rapid new method for the detection of *M. gallisepticum*.

METHODS

Identification of mycoplasma strains isolated from geese with serological methods.

Determination of the DNA G+C content of the isolates.

Experimental infection of chicken embryos with *M.gallisepticum*, and subsequent reisolation of the pathogenic strain.

Pathological, histopathological and electronmicroscopical examination of the histological lesions.

Comparison of different isolates of *M. gallisepticum* by SDS-polyacrylamide gelelectrophoresis.

Comparison of **restriction endonuclease cleavage patterns** of DNA of the different isolates.

Construction of a partial genomic library of *M. gallisepticum* strain S6.

Selection of a species-specific DNA probe for dot and Southern hybridisations.

Determination of the sensitivity of DNA probe by dot hybridisation.

Development of a nonradioactive direct filter hybridisation (DFH) assay.

RESULTS AND DISCUSSION

Preliminary serological and biochemical experiments carried out by Dr. S. Varga, in Dr. Stipkovits's lab demonstrated, that three (strain 1219, 1220 and 1222) out of the four (strain 1219, 1220, 1221 and 1222) mycoplasma strains isolated from geese have no relationship with known mycoplasma species. After antibody production against the new isolates in rabbits and using it in growth inhibition test it was shown that strains 1219 and 1222 were identical, while strain 1221 was related to the previously described species, *M. cloacale*.

Upon description and classification of a new mycoplasma species, beside the biochemical and serological tests it is a strict requirement to determine the DNA base composition of the isolates. By measurement of the DNA melting temperature of the strains it was found that strain 1219, 1220 and 1221 have a G+C content of 28.55 mol%, 27.60 mol% and 26.50 mol%, respectively (unpublished data). These low DNA G+C contents of the strains

G+C contents of the strains (26-29mol%) confirm that the isolates are not bacterial L-forms, but mycoplasmas indeed.

To describe these mycoplasma strains as new species, the serological results obtained by growth inhibition test has to be confirmed by other immunological methods (i.e. double immunodiffusion, metabolic inhibition test) as well.

The hypothesis, that the newly described two mycoplasma species are involved and have etiological role in the reproductive failure and infertility of layers and gunderes has to be proved by experimental infection.

By experimental infection of chicken embryos it was confirmed, that *M. gallisepticum* entering the egg during incubation kills only some of the embryos and infected survivors may hatch playing role in spreading the infection.

It was demonstrated by electronmicroscopic studies that mycoplasmas can be found not only extracellularly, but intracellularly as well. We were not able to answer the question whether mycoplasmas found in the cytoplasm are viable, because reisolates could originate from the extracellular space as well.

The restriction enzyme cleavage pattern of six *M. gallisepticum* strains isolated from different pathological cases, originating from different part of the world was compared. Genetic polymorphism among *M. gallisepticum* strains was demonstrated based on their DNA cleavage patterns obtained after digestion with four restriction endonucleases (HindIII, BamHI, PstI and XhoI). The strains could be classified into four groups, based on their DNA cleavage patterns. Genetic heterogeneity among strains was confirmed by Southern analysis using a 800 bp. cloned mycoplasma DNA fragment as a

probe. Genetic polymorphism was reflected also in the protein patterns of the strains, obtained by SDS polyacrylamide gelelectrophoresis.

A partial genomic library of *M. gallisepticum* was constructed and a species-specific DNA probe was selected. This probe recognised strains of *M. gallisepticum* exclusively and did not react with other mycoplasma species, such as *M. pullorum*, *M. gallinaceum*, *M. gallopavonis*, *M. gallinarum* frequently present in the respiratory organs of chickens. There was no cross reaction with bacteria either (*E. coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium*, *Salmonella typhimurium*, and *Salmonella gallinarum*).

Sensitivity of the probe was determined by dot hybridisation, 0.5 ng purified DNA was detectable after 6 hrs exposure. This is the DNA content of approx. 5×10^4 mycoplasma cells.

This test proved to be rapid and highly sensitive, nevertheless using radioactive materials in conventional diagnostic laboratories has its own limitation.

A simple, rapid and harmless DNA hybridisation test was developed by Drs. Belak and Linne at Virology Department of the National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden. One of the main characteristic of this so called "direct filter hybridisation assay" (DFH) is that the test can be performed directly from clinical materials -without prior purification of nucleic acids-. The second advantage of the test is the use of harmless biotin for labeling the probe. Originally this assay was developed for the detection of viruses. In collaboration with the Swedish colleagues we adapted this test for the detection of mycoplasmas. It was demonstrated that the simplified test still kept specificity for *M. gallisepticum* strains and did not react with 34 other mycoplasma and acholeplasma species. The sensitivity of the biotin-labeled

probe was slightly decreased compared to the radioactive probe, but it was still able to detect 9×10^4 mycoplasma cells.

NEW FINDINGS

Four mycoplasma strains of goose origin have been isolated and characterised. Our results indicate, that two isolates may represent new mycoplasma species.

We were among the firsts who succeeded to demonstrate that intraspecies genetic polymorphism exists among *M.gallisepticum* strains.

We developed the first species-specific DNA probe for the detection of *M. gallisepticum*.

BIOTECHNOLOGICAL IMPORTANCE

Based on DNA hybridisation a rapid diagnostic test was developed for the detection of *M. gallisepticum*, the etiological agent of chronic respiratory disease of chickens. This method is highly specific for *M. gallisepticum* and very sensitive (5×10^4 cells can be detected). One minor disadvantage of the test is the use of radioactive material, which limits its use in routine diagnostic labs. Therefore we modified our method and adapted a rapid, harmless, direct filter hybridisation assay (DFH), in which the probe is labeled by nonradioactive biotin.

Currently we are improving our diagnostic test, and by development of a polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of *M. gallisepticum*, the rapidity, and simplicity could be greatly enhanced. This test must be successfully used in veterinary diagnostic laboratories in the field.

9. IRODALOMJEGYZÉK:

1. Stanbridge,E. 1971. Mycoplasmas and cell cultures. Bacteriological Reviews,35.206-227.
2. Baril,M.F. and Razin,S. 1979. In Cell Biology. The Mycoplasmas Vol.1., Academic Press Inc., New York.
3. Razin,S. 1985. Molecular biology and genetics of mycoplasmas (*Mollicutes*). Microbiological Reviews, 49. 419-455.
4. Manninger,R., és Mészáros,J. 1975. A háziállatok fertőző betegségei. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
5. Eaton,M.D., and Liu,C. 1957. Studies on sensitivity to streptomycin of the atypical pneumonia agent. J. Bacteriol.74.784-787.
6. Chanock,R.M., Hayflick,L., and Barile,F. 1962. Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 48.41-49.
7. Taylor-Robinson,D., Furr,P.M., and Hanna,N.F. 1985. Microbiological and serological study of nongonococcal urethritis with special reference to *Mycoplasma genitalium*. Genitourin.Med. 61.319-324.
8. Blanchard,A., and Montagnier,L. 1994. AIDS-associated mycoplasmas. Annu. Rev. Microbiol. 48.687-712.
9. Nelson,J.B. 1935. Coccobacilliform bodies associated with infectious fowl coryza. Science, 82.43-44.
10. Adler,H.E., Yamamoto,R., and Berg,J. 1957. Strain differences of pleuro-pneumonia like organism of avian origin. Avian Diseases, 1.19-27.
11. Van Roekel,H., Olesiuk,O.M., and Peck,H.A. 1952. Chronic respiratory disease of chickens. Am.J.Vet.Res. 13.252-259.

12. Kerr,K.M., and Olson,N.O. 1966. Cardiac pathology associated with viral and mycoplasmal arthritis in chickens. 2nd Conf.Biol.Mycoplasma, N.Y.Acad.Sci. May.
13. Clyde,W.A. and Thomas,L. 1973. Tropism of *Mycoplasma gallisepticum* for arterial walls. Proc.Nat. Acad.Sci.USA.70.1545-1549
14. Porta,J.R. Solsona,M.J., and Ponsa,F. 1992. *Mycoplasma gallisepticum* incidence in broiler and layer breeders in Catalonia (Spain). Proc. 9th European Poultry Conference , Glasgow, UK., Aug.7-14. 1994.Voll.p.167.
15. Subcommittee on the taxonomy of *Mollicutes*.1984. Int.Syst.Bacteriol.34.358-360.
16. Higgins,P.A., and Whithear,K.G. 1985. Detection and differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* antibodies in chicken serum using enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Diseases, 30.160-168.
17. Erno,H. and Stipkovits,L. 1973. Bovine mycoplasmas: cultural and biochemical studies. Acta Vet. Scand. 14. 436-449.
18. Stipkovits,L., Varga,Zs., Czifra,G., and Dobos-Kovács,M. 1986. Occurrence of mycoplasmas in geese affected with inflammation of the cloaca and phallus. Avian Pathology, 15.289-299.
19. Marmur,J., and Doty,P. 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. J. Mol. Biol.5. 109-118.
20. Bradbury,J.M., and Forrest,M. 1984. *Mycoplasma cloacale*, a new species isolated from a turkey. Int.J.Syst.Bacteriol. 34. 389-392.
21. Göbel,U.B., and Stanbridge,E.J. 1984. Cloned mycoplasma ribosomal RNA genes for the detection of mycoplasma contamination in tissue cultures. Science, 226.1211-1213.

22. Göbel,U., Maas,R., Haun,G., Vinga-Martins,C. and Stanbridge,E.J. 1987. Synthetic oligonucleotide probes complementary to rRNA for group and species-specific detection of mycoplasmas. *Isr.J.Med.Sci.* 23.742-746.
23. Taylor,M.A., Wise,K.S. and McIntosh,M.A. 1984. Species-specific detection of *Mycoplasma hyorhinis* using DNA probes. *Isr.J.Med.Sci.* 20. 778-780.
24. Taylor, M.A., Wise,K.S. and McIntosh M. 1985. Selective detection of *Mycoplasma hyorhinis* using cloned genomic DNA fragments. *Infection and Immunity.* 47. 827-830.
25. Hyman,H.C., Yogev,D., and Razin,S. 1987. DNA probes for detection and identification of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *J. Clin. Microbiol.* 25. 726-728.
26. Belák,S., Rockborn,G., Wierup,M., Belák,K., Berg,M., and Linné,T. 1987. Aujeszky' s disease in pigs diagnosed by a simple method of nucleic acid hybridization. *J. Vet. Medicine,* 34.519-529.

A Ph.D. értekezés tárgyát képező közlemények listája

1. Stipkovits,L., Varga,Z., Dobos-Kovács,M., and **Sántha,M.** 1984. Biochemical and serological examination of some *Mycoplasma* strains of goose origin. *Acta Veterinaria Hungarica*, 32. 117-125.
2. Varga,Z., Stipkovits,L., Dobos-Kovács,M., and **Sántha,M.** 1986. Investigation of Goose Mycoplasmas. *Archiv für Experimentelle Veterinarmedizin*, 40. S105-108.
3. Glávits,R., **Sántha,M.**, Rátz,F., Molnár,E. és Stipkovits,L. 1986. Pathological and immunological studies on chicken embryos and day-old chicks experimentally infected with *Mycoplasma gallisepticum*. *Acta Veterinaria Hungarica*, 34. 189-200.
4. Glávits,R., **Sántha,M.**, Rátz,F., Molnár,E., és Stipkovits,L. 1986. *Mycoplasma gallisepticummal* kísérletesen fertőzött tyúkembriók és csibék kórtani és immunológiai vizsgálata. Autoreferátum. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 11. 685-688.
5. **Sántha,M.**, Lukács,K., Burg,K., Bernáth,S., Raskó,I., and Stipkovits,L. 1988. Intraspecies genotypic heterogeneity among *Mycoplasma gallisepticum* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 54.607-609.
6. **Sántha,M.**, Burg,K., Raskó,I., and Stipkovits,L. 1987. A species-specific DNA probe for the detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Infection and Immunity* 55. 2857-2859.

7. Stipkovits L., Belák,S., McGwire,B.S., Ballagi-Pordány,A., and Sántha,M. 1988. Rapid identification of *Mycoplasma gallisepticum* using a simple method of nucleic acid hybridization. *Molecular and Cellular Probes*. 2. 339-344.

Előadások az értekezés témaköréből:

1. Sántha,M., Lukács,K., Bernáth,S., Burg K., Varga,Z., Raskó,I., és Stipkovits,L.: Libából izolált mycoplasma-törzsek összehasonlító vizsgálata. Magyar Mikrobiológiai Társaság 10. Kongresszusa. 1987. augusztus 26-29. Szeged.

2. Varga,Z., Stipkovits,L., Sántha,M., Dobos-Kovács,M.: Liba eredetű mycoplasma-törzsek vizsgálata. Magyar Mikrobiológiai Társaság 10. Kongresszusa. 1987. augusztus 26-29. Szeged.

3. Sántha,M., Lukács,K., Burg,K., Bernáth,S., Raskó,I., és Stipkovits,L. : *Mycoplasma gallisepticum* törzsek genetikai analízise. Magyar Mikrobiológiai Társaság 10. Kongresszusa. 1987. augusztus 26-29. Szeged.

További közlemények:

Boisseau,S., Poirier,V. Semonin,O., Leconte,L., Sántha,M., Poujeol,C., Rougon,G. and Simonneau,M. 1991. A mammalian in vitro model to study

gangliogenesis from neural crest cells. *Journal of Physiology, Paris*, 85. 117-122.

Raskó,I., Georgieva,M., Farkas,G., **Sántha,M.**, Coates, J., Burg,K., Mitchell,D.L., and Johnson,R.T. 1993. New patterns of bulk DNA repair in ultraviolet irradiated mouse embryo carcinoma cells following differentiation. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 19. 245-255.

Leconte,L., **Sántha,M.**, Fort,C., Poujeol,C., Portier,M.M., and Simonneau,M. 1996. Cell type-specific expression of the mouse peripherin gene requires both upstream and intragenic sequences in transgenic mouse embryos. *Developmental Brain Research*, 92. 1-9.

Sántha,M., Leconte,L., Poujeol,C., and Simonneau,M. 1996. Analysis of the expression pattern of the mouse peripherin gene during embryogenesis in transgenic mice. *Cell Biol. Int.* 20.225.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki a téma elindítójának, **Dr. Stipkovits Lászlónak**, szakmai irányításáért, hasznos tanácsaiért; **Dr. Raskó Istvánnak**, hogy lehetőséget biztosított arra, hogy laboratóriumában mycoplasma molekuláris biológiai munkát végezhessünk és aki mindvégig irányította az itt folyó munkámat. Külön köszönöm **Dr. Burg Kornélnak**, hogy a molekuláris biológiai alaptechnikákra megtanított. Köszönöm munkatársaimnak, **Dr. Varga Zsuzsannának**, **Dr. Glávits Róbertnek**, **Dr. Bernáth Sándornak**, **Lukács Klárának** és **Dr. Belák Sándornak** közös munkáink során végzett együttműködésüket és segítségüket. **Dr. Varga Jánosnének**, **Dr. Kulcsár Andornének**, **Palatka Zoltánnének**, **Nagy Erikának**, **Gyulai Ildikónak** és **Berki Gabriellának** kitűnő technikai segítségéért tartozom hálás köszönettel. Az értekezés külalakjának kialakítása **Zvara Ágnes** és **Kalmár Tibor** érdeme.

Végül szeretnék köszönetet mondani **szüleimnek** és **családomnak** türelmükért, valamint a "nyugodt háttér" biztosításáért.