

**The core genome
multi-locus sequence
typing of *Mycoplasma
anserisalpingitidis****

Á. B. Kovács^{1,2*}
Zs. Kreizinger¹
B. Forró¹
D. Gróznér¹
A. Mitter¹
Sz. Marton^{1,2}
K. Bali^{1,2}
A. Sawicka³
G. Tomczyk³
K. Bányai^{1,2,4}
M. Gyuranecz^{1,2,5}

*Bővített másodközlés
A munka Kovács et al.
BMC Genomics. 2020;21:403. cikk
eredményeinek, ill. a témában
végzett újabb vizsgálatok ismertetése

1. Állatorvostudományi Kutatóintézet,
H-1143 Budapest, Hungária krt. 21.

2. Fertőző Állatbetegségek,
Antimikrobiális Rezisztencia,
Állatorvosi Közegészségügy
és Élelmiszerlánc-biztonság
Nemzeti Laboratóriuma,
Állatorvostudományi Kutatóintézet,
Budapest

3. Állatorvostudományi Kutatóintézet,
Pulawy, Lengyelország

4. Gyógyszertani és Méregtani
Tanszék, Állatorvostudományi Egyetem,
Budapest

5. Járványtani
és Mikrobiológiai Tanszék,
Állatorvostudományi Egyetem, Budapest

**e-mail: kovcsboti@hotmail.com

BAROMFI

Mycoplasma anserisalpingitidis törzsek vizsgálata a maggenomot célzó multilókusz szekvenciatipizáló módszerrel*

**Kovács Áron Botond^{1,2}, Kreizinger Zsuzsa¹, Forró Barbara¹, Gróznér Dénes¹,
Mitter Alexa¹, Marton Szilvia^{1,2}, Bali Krisztina^{1,2}, Anna Sawicka³,
Grzegorz Tomczyk³, Bányai Krisztián^{1,2,4}, Gyuranecz Miklós^{1,2,5}**

ÖSSZEFOGLALÁS

A *Mycoplasma anserisalpingitidis* jelentős anyagi károkat okozó vízibaromfi-patogén baktérium. A vizsgálatukban a szerzők fajra jellemző, alapgénkészletre („mag” genomra) hoztak létre egy multilókusz szekvenciatipizáló sémát, amely elősegíti a *M. anserisalpingitidis* változatosságának pontosabb diagnosztizálását. A séma fejlesztése során 110 *M. anserisalpingitidis* törzset vizsgáltak, ezek elsősorban Európából származtak, de kínai és vietnámi mintákat is elemeztek. Az általuk fejlesztett tipizáló módszer segítségével sikeresen azonosítottak egy állattenyésztési integrációból származó mintákat, ill. egy állományból, vagy egy állatból származó mintákat is.

SUMMARY

Background: *Mycoplasma anserisalpingitidis* is a waterfowl pathogen that mainly infects geese, and can cause significant economic losses. With the advance of whole genome sequencing technologies, new methods are available for the researchers; one emerging methodology is the core genome Multi-Locus Sequence Typing (cgMLST). The core genome contains a high percentage of the coding DNA sequence (CDS) set of the tested strains.

Objectives: The aim of this study was to set up a precise and robust cgMLST schema for the genotyping of *M. anserisalpingitidis* strains.

Materials and Methods: In this study, Illumina short reads of 107 *M. anserisalpingitidis* strains were used along with 3 complete genomes from the NCBI database, including samples from Hungary, Poland, Vietnam, and China (110 samples overall). Draft genomes were assembled with the SPAdes software and analyzed with chewBBACA program. The threshold of the presence of CDS in the strains was set to 95%, resulting in the most accurate and robust schema. Five hundred forty CDSs constituted our cgMLST schema (representing 68.87% of the whole CDS set of *M. anserisalpingitidis* ATCC BAA-2147), and a Neighbor joining tree was created using the allelic profiles.

Result and Discussion: The phylogenetic tree from the cgMLST schema resembled the real-life relationships of the strains. The schema allowed to differentiate between strains from different integrations and managed to group the strains by geographical origin and isolation date and even strains from the same animal.

A *Mycoplasma anserisalpingitidis* egy vízibaromfi-patogén baktérium, amelyet 1983-ban Magyarországon izoláltak először [1], azóta a világ számos pontján leírták az előfordulását [2–4], de a baktériumfaj pontos jellemzésére csak a közelmúltban került sor [5]. A *M. anserisalpingitidis* elsősorban libákban fordul elő, de kacsából is izolálták már [6], ill. vándor vízimadarakat is megfertőzhet [7, 8]. A fajra jellemző mind a vertikális, mind a horizontális terjedés, ez utóbbihoz jelentősen hozzájárulhatnak a stresszfaktorok, mint a hideg, esős időjárás vagy a nem megfelelő tartási körülmények. A baktérium komoly gazdasági károkat okozhat [9–11] elsősorban a tojáshozam vagy a testtömeg-gyarapodás csökkenése révén, de a kloáka és az ivarszervek gyulladása, az idegrendszeri és légzőszervi megbetegedések, valamint az embrió mortalitás növekedése is szerepet játszhat ebben [10–12].

A *M. anserisalpingitidis* egy vízibaromfi-patogén baktérium, amelyet 1983-ban Magyarországon izoláltak először

A *M. anserisalpingitidis* örökítőanyagáról korlátozottak az ismereteink, a baktérium feltérképezése érdemileg csak az utóbbi években kezdődött meg. Kutatócsoportunk 2019-ben a faj azonosítására alkalmas polimeráz láncreakciót (PCR) írt le [6], 2020-ban pedig részt vettünk a baktérium teljeskörű jellemzésében [5]. Mivel a *M. anserisalpingitidis* ellen jelenleg nincs kereskedelmi forgalomban elérhető vakcina – többek között a baktérium tulajdonságainak kevésbé ismert mivolta miatt –, ezért a megbetegedések kivédésében a fertőzés megelőzése a cél, elsősorban a megfelelő tartási körülmények betartásával. A betegség antibiotikumterápiával kezelhető, azonban a használandó hatóanyag kiválasztását nehezíti a különböző antibiotikumokkal szembeni rezisztencia széles körű elterjedtsége [13].

Az MLST általában 5–7 génszakasz polimorfizmusán alapuló molekuláris biológiai módszer

A hagyományos multilókusz szekvenciátípezés (Multi-Locus Sequence Typing, MLST) az egyik legelterjedtebb, általában 5–7 génszakasz polimorfizmusán alapuló molekuláris biológiai módszer [14, 15]. A módszer céljait az anyagcsere alapfolyamatait meghatározó gének, úgynevezett háztartási gének jelentik, mivel ezek minden törzsből előfordulnak. A vizsgálat során az egyes génszakaszok szekvenciái között lévő különbségeket, mutációkat tárják fel és hasonlítják össze, ezek alapján történik az egyes génszakaszokra vonatkozó alléltípusok meghatározása, az alléltípusok kombinációjából pedig a szekvenciátípus (sequence type, ST) megállapítása. A kisszámú háztartási gén használata lehetővé teszi a módszer alkalmazását olyan törzseknél is, amelyek esetén teljes genomszekvenálásra nincs lehetőség. A *M. anserisalpingitidis* esetében témacsoportunk dolgozta ki a multilókusz szekvenciaanalízis alapjait [3].

Maggenomnak nevezzük a törzsek többségében előforduló DNS-szekvenciákat

Fontos azonban megemlíteni, hogy a hagyományos MLST felbontóképessége jelentősen rosszabb, mint a „mag” genom (core-genome) (cg)MLST módszerből származó sémáé. Mag- vagy coregenomnak nevezzük a vizsgált törzsek többségében (általában ≈95%-ában) előforduló kódoló DNS-szekvenciákat (coding sequence, CDS). A génszekvenciák (bár a CDS és a gén kifejezést felcserélve használjuk, a kettő nem teljesen fedi le ugyanazokat a genetikai elemeket) nagy száma miatt a cgMLST módszer pontosabb felbontást tesz lehetővé, a nagyszámú gén vizsgálata hatékonyabbá teszi az elemzést. Míg régebben egy-egy baktériumgenom teljes bázissorendjének meghatározása drága és időigényes folyamat volt, addig napjainkra az újgenerációs szekvenálási eljárások megjelenésével és térhódításával, a módszerek folyamatos továbbfejlesztésével gyorsan és költséghatékonyan lehet nagyszámú baktériumtörzs teljes genomszekvenciáját meghatározni.

Munkánk során célul tűztük ki egy olyan robusztus és pontos tipizáló rendszer kidolgozását a *M. anserisalpingitidis*-re, amely a teljes genomszekvenciákból meghatározott maggenom génjeit elemzi a multilókusz szekvencia tipizálás módszerével.

ANYAG ÉS MÓDSZER

TÖRZSEK TELJES GENOMSZEKVENÁLÁSA

Vizsgálataink során összesen 107 *M. anserisalpingitidis* törzs (Magyarországról ($n = 97$), Lengyelországból ($n = 7$), Vietnámból [3] ($n = 1$), ill. Kínából [2] ($n = 2$)) genomszekvenciáját határoztuk meg. További három, az NCBI adatbázisában online elérhető *M. anserisalpingitidis* törzs (MYCAV93, MYCAV177 és ATCC BAA-2147) szekvenciáját is felhasználtuk elemzéseinkben [16]. A szekvenálás során kapott rövid szekvenciákból, minőségellenőrzést követően állítottuk össze az úgynevezett „nyers” genomokat a SPAdes szoftver segítségével [17].

MYCOPLASMA ANSERISALPINGITIDIS CGMLST SÉMA LÉTREHOZÁSA ÉS FILOGENETIKAI ANALÍZISE

A cgMLST vizsgálatokra egyaránt használhatóak licenszköteles szoftverek (mint a madáreredetű *Mycoplasma* fajoknál alkalmazott Ridom SeqSphere+ [<http://ridom.de/seqsphere/>]; vagy Bionumerics [<https://www.applied-maths.com/applications/wgmlst>] szoftverek), ill. nyílt forráskódú, ingyenes eszközök, mint pl. a BSR-Based Allele Calling Algorithm (chewBBACA) [18].

A cgMLST séma kidolgozását és az általunk használt szoftver (chewBBACA) sematikus működését az 1. ábrán mutatjuk be. A törzsek „nyers” genomjának összeállítását követően, a folyamat első lépésében, egy a teljes genomra (azaz whole-genome vagy wg) vonatkozó MLST sémát dolgoztunk ki, amely a vizsgált törzsek összes génjét vette alapul – a teljes genom jelen esetben a minden tör-

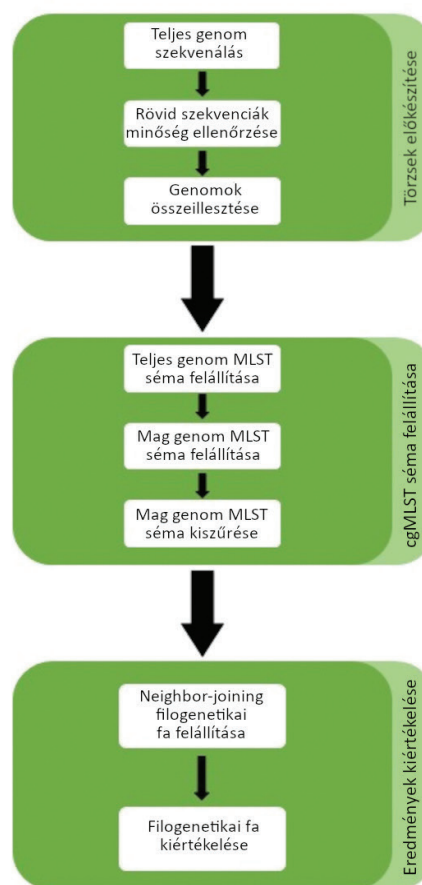
**Maggenomvizsgálaton
alapuló
MLST-rendszer
kidolgozását
tűzték ki célul**

1. ÁBRA. A vizsgálat folyamatábrája

Az első lépésben kidolgozzuk a teljes genomra kiterjedő wgMLST (whole genome multi-locus sequence typing) rendszert, amely a vizsgált törzsekben megtalálható összes gént tartalmazza. A második lépésben megtörténik a génszekvenciák jelenlétének ellenőrzése és a jelenléti küszöbérték alapján történő szűrés. A végső lépés a kapott cgMLST (core genome multi-locus sequence typing) sémából filogenetikai fa elkészítése és ennek kiértékelése

FIGURE 1. The workflow of the study

In the first step the whole genome multi locus sequence typing (wgMLST) schema was set up, which contains all o the genes in the strains. In the next step the presence of the gene sequences were checked and the results were filtered based on the presence/absence threshold. In the final step a core genome (cg) MLST schema was acquired and a phylogenetic tree was set up



**M. anserisalpingitidis
törzsek teljes
genomszekvenciáit
hasonlították össze**

zsben megtalált, összes kódoló szekvenciát jelenti. A következő lépésben összehasonlítottuk a megtalált géneket, a szoftver értékelte és pontozta azokat többek között az alapján, hogy az adott génben hány pontmutáció (single nucleotide polymorphism, SNP) volt megtalálható, az adott gén hány genomban volt jelen és az adott génnek volt-e homológja. A maggenom MLST séma kidolgozásának utolsó lépése az volt, hogy teljes genomra vonatkozó MLST sémából kiszűrtük azokat a géneket, amelyek nem feleltek meg a cgMLST feltételeinek; pl. a gén a meghatározott küszöbértéknél kevesebb törzsből volt megtalálható. A *M. anserisalpingitidis* esetében 95%-os jelenléti küszöbértéket határoztunk meg, azaz egy adott génnek a vizsgált törzsek ekkora százalékában jelen kellett lennie. Ez az érték megegyezett a cgMLST vizsgálatokban általánosan alkalmazott értékkel. Az így kapott cgMLST séma alapján pedig leszármazási viszonyokat tükröző filogenetikai fát készítettünk (GrapeTree szoftverrel [19] készített Neighbor-Joining [20] filogenetikai fa).

EREDMÉNYEK**TÖRZSEK TELJES GENOMSZEKVENÁLÁSA**

Százhet *M. anserisalpingitidis* törzs „nyers” genomját határoztuk meg, ezek hosszabb-rövidebb DNS-szekvenciákból épültek fel, a leghosszabb szakasz átlagosan 135 501 nukleotidból állt. A teljes genomok rövid szekvenciái az NCBI SRA adatbázisban (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) az alábbi azonosítókkal találhatóak meg: PRJNA553666, PRJNA554567, PRJNA554588, PRJNA602206, PRJNA602215, PRJNA650261, ill. PRJNA856806.

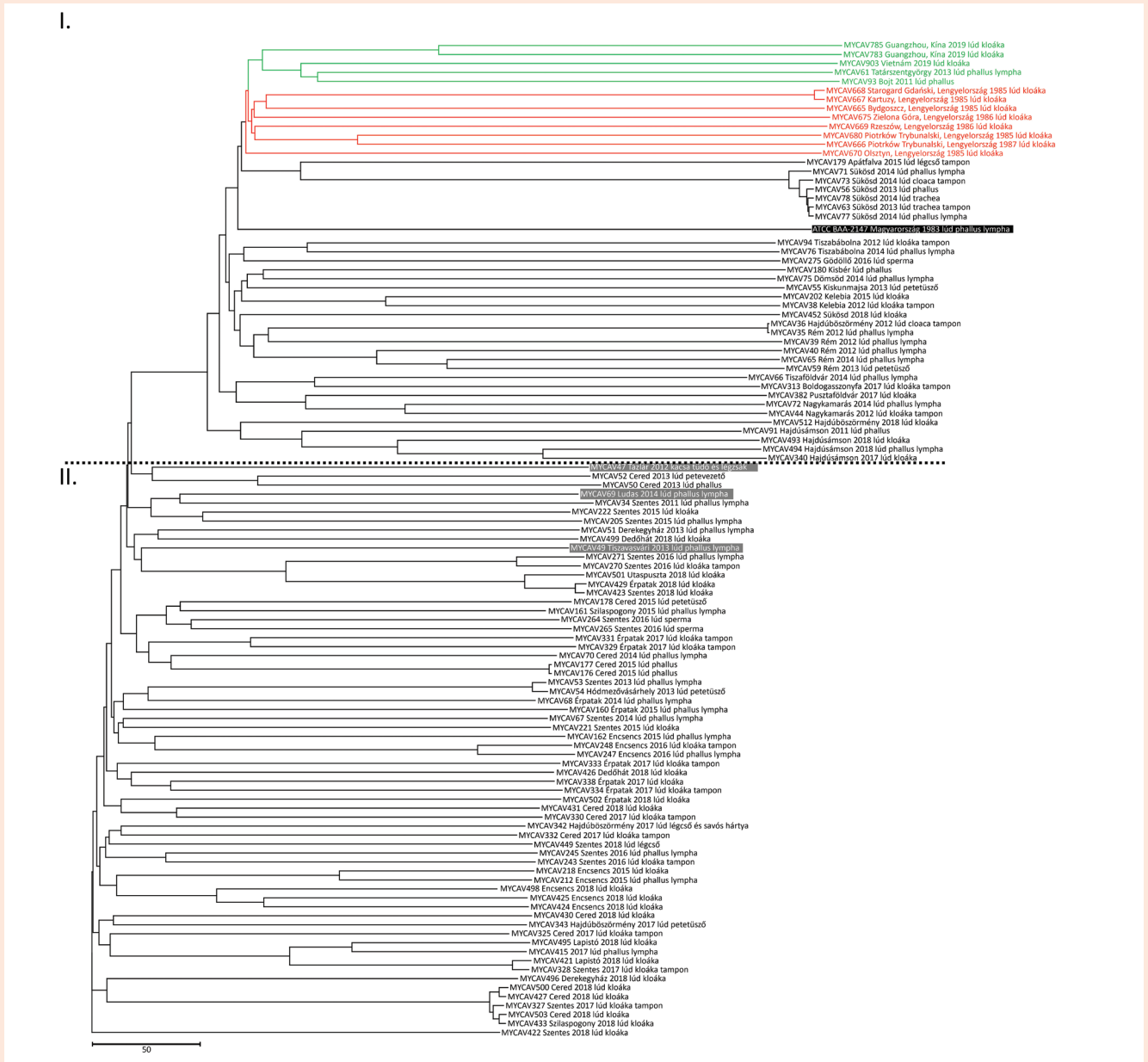
**MYCOPLASMA ANSERISALPINGITIDIS CGMLST SÉMA LÉTREHOZÁSA
ÉS FILOGENETIKAI ANALÍZISE**

A cgMLST séma 540 CDS-t tartalmazott, amely az ATCC BAA-2147 referens törzs CDS készletének (784 CDS) a 68,87%-ának felelt meg. A CDS-ek átlag hossza 1178 bázispár (bp) (Minimum: 213 bp Maximum: 6210 bp) volt. Az egybefűzött séma 539 346 bp hosszú volt, amely a referens törzs genomjának 56,18%-ának felelt meg.

A cgMLST sémából készített filogenetikai fa két fő csoportba osztotta a törzseket. A különböző állattenyésztési integrációkból származó törzseket az „I-es” klaszterbe, míg az ismert, egy integrációba tartozó törzseket (három kivételtől eltekintve) a „II-es” klaszterbe sorolta; az eredményeket a 2. ábrán szemléltetjük.

Összefüggés volt megfigyelhető az I-es klaszter tagjai esetén, a törzsek cgMLST sémájának variációiban és a földrajzi eredetük között. Az egy országból, egy földrajzi helyről származó törzsek is többségben egy-egy kládba rendeződtek a filogenetikai fán, ezen felül az egy országból (pl. lengyelországi törzsek, 2. ábrán pirossal kiemelt törzsek) vagy az egy településről származó törzsek (pl. MYCAV91 [Hajdúsámson, 2011, lúd phallus], MYCAV340 [Hajdúsámson, 2017, lúd kloáka], MYCAV493 [Hajdúsámson, 2018, lúd kloáka] és MYCAV494 [Hajdúsámson, 2018, lúd phallus lymphá]), külön szubkládokat alkottak az I-es klaszteren belül. Ez alól kivételt képezett öt törzs (MYCAV93 [Bojt, 2011, lúd phallus], MYCAV61 [Tatárszentgyörgy, 2013, lúd phallus lymphá], MYCAV903 [Vitenám, 2019, lúd kloáka], MYCAV783 [Guangzhou, Kína, 2019, lúd kloáka] és MYCAV785 [Guangzhou, Kína, 2019, lúd kloáka], zölddel jelölve az I-es klaszterben), amelyek részben távol-keleti és részben hazai izolálásból származtak. Ezek az atípusos törzsek jelentős különbséget mutattak a többi törzstől mind genetikai, mind fenotípusos szinten. A Sükösdről származó törzsek szintén egy különálló szubkládot alkottak. A törzsek jó példával szolgálnak arra, hogy az évek során milyen különbségek alakulhatnak ki a törzsek között. Bár a MYCAV452-es törzs ugyanarról a telepről származott, mint a többi sükösdi törzs, azonban az izolálások között több év telt el: a MYCAV452-es törzs 2018-ban, míg a MYCAV56, 63, 71, 73, 77 és MYCAV78 2013-ban, valamint 2014-ben lettek kitenyésztve.

**Az egy országból,
egy földrajzi helyről
származó törzsek is
többségben egy-egy
kládba rendeződtek**



2. ÁBRA. *M. anserisalpingitidis* törzsek cgMLST (core genome multi-locus sequence typing) vizsgálata alapján létrehozott filogenetikai fa. Minden törzs azonosítója mellett látható a földrajzi elhelyezkedés, az izolálás éve, valamint az állatfaj és a mintatípus, amiből a tenyésztés történt. Az ábra felső felében (I-es jelölés) a különböző integrációba tartozó törzsek láthatóak, míg az alsó felében (II-es jelölés) az egy integrációból származó törzsek találhatók. Az I-es kládban zöld színnel jelöltük az atípusos *M. anserisalpingitidis* törzseket, amelyek közül három Távol-Keletről származik (Kína és Vietnám), kettő pedig hazai izolátum; pirossal a Lengyelországból származó törzseket jelöltük. Az ATCC BAA-2147 típusörzset fekete, míg a II-es kládban három, nem az integrációba tartozó törzset szürke háttérrel jelöltünk. Míg az I-es kládban elsősorban a földrajzi elhelyezkedés alapján csoportosulnak a törzsek, a II-es kládban inkább az izolálás dátuma alapján történő csoportosulás a jellemző.

FIGURE 2. The phylogenetic tree based on the cgMLST schema of the *M. anserisalpingitidis* strains

The geographical data, isolation date, the host species and the sample type can be seen next to the ID of the strains. In the upper part of the figure (labeled „I”) the strains are from different integrations, while the strains in the lower part (labeled „II”) are mostly from the same integration. In the clade „I” in green five atypical *M. anserisalpingitidis* strains can be seen, three of these are from Asia (China and Vietnam), two are from Hungary, while the strains in red originated from Poland. The type strains ATCC BAA-2147 can be seen with black background, while three strains that do not belong to clade „II” can be seen with gray background. In clade „I” the strains mainly grouped together based on geographical location, while in clade „II” the strains mainly grouped together based on isolation date.

**Az egy integrációból
származó törzsek
esetén a törzsek
elsősorban a földrajzi
elhelyezkedés alapján
csoportosultak**

Az egy integrációból származó törzsek esetén a törzsek elsősorban a földrajzi elhelyezkedés alapján csoportosultak a filogenetikai fán, azonban gyakran megfigyelhető volt izolálási idő alapú csoportosulás is. Néhány esetben megfigyelhető volt, hogy egy telepről, de eltérő állatokból és szervekből származó törzsek közötti nagyobb genetikai változatosság (MYCAV177 [Cered, 2015, lúd phallus] és MYCAV178 [Cered, 2015, lúd petetüsző], valamint a MYCAV342 [Hajdúböszörmény, 2017, lúd légcső és savóshártya] és MYCAV343 [Hajdúböszörmény, 2017, lúd petetüsző]). Fontos megemlíteni, hogy három törzs (2. ábrán szürke háttérrel jelölve), amelyek a II-es klaszterben volt található, nem tartozott a klasztert alkotó integrációba. Az egyik ilyen törzs a MYCAV47 – amelyet kacsából izoláltak Tázlárón – az egyetlen kacsaaeredetű törzs a gyűjteményünkben. Az azonos állattartó telepről származó törzsek általában egy ágon foglaltak helyet a filogenetikai fán (mint a MYCAV212 [Encsencs, 2015, lúd phalluslympha] és MYCAV218 [Encsencs, 2015, lúd kloáka] vagy a MYCAV247 [Encsencs, 2016, lúd phallus lympha] és MYCAV248 [Encsencs, 2016, lúd kloáka]).

MEGVITATÁS

A *M. anserisalpingitidis* első megjelenéséről már több mint negyven éve beszámoltak (akkor még *Mycoplasma* sp. 1220 jelzést kapott), azonban a kórokozó genetikai jellemzése egészen a 2010-es évek második feléig váratott magára. A baktérium gazdasági kártétele jelentős, vakcina híján a védekezés legjobb módja a fertőzés, valamint a tünetek megjelenésének megelőzése, kialakult fertőzés esetén pedig az antibiotikumos kezelés alkalmazása. Mivel az antibiotikumrezisztens patogének száma világszerte egyre növekszik (<https://www.oie.int/en/for-the-media/amr/>, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>) fontos a baktériumok – így a *M. anserisalpingitidis* – folyamatos vizsgálata és megfigyelése. A teljes genom szekvenálás széles körben való elterjedésével lehetőség nyílik olyan módszerek kidolgozására, amelyek a baktériumok génkészletének mélyreható tanulmányozására alkalmasak. Ilyen pl. a cgMLST módszer, ami a vizsgált törzsek teljes genomjából a törzsek nagy többségében megtalálható kódoló szekvenciákat és az azokban megtalálható pontmutációkat elemző, rendkívüli megkülönböztető erővel és stabilitással bíró diagnosztikai módszert jelent. A *Mycoplasma* fajokra jellemző nagy mutációs ráta azonban megnehezíti a törzsek vizsgálatát [21, 22]. Az eredeti *M. anserisalpingitidis* cgMLST séma felállítása óta, a chewBACCA szoftver ki lett bővíthető, így jobban alkalmazható más baktériumfajra. Ez a minőségi javulás a szoftverben, lehetővé tette, hogy a kibővített séma esetén szigorúbb kritériumot alkalmazzunk (az eredeti 93%-os helyett, 95%-os küszöbértéket).

Munkánk során a világon elsőként írtunk le *M. anserisalpingitidis* fajt célzó cg-MLST rendszert. A vizsgálathoz nyílt forráskódú szoftvert használtunk, a végső *M. anserisalpingitidis* cgMLST séma 540 kódoló DNS szekvenciából áll, ami az ATCC BAA-2147 referens törzs kódoló szekvenciáinak 68,87%-át teszi ki. Bár további szekvenálásokkal még potenciálisan tovább lehet finomítani a cgMLST rendszert, fontos megjegyezni, hogy a jelen vizsgálatban kapott eredményeink átfedtek az epidemiológiai adatokkal, emiatt nem láttuk szükségességét a további, mélyebb szekvenálásnak. Az általunk kialakított séma alkalmas volt az összes törzs pontos elkülönítésére, ill. módszerünk a törzsek pontos csoportosítását is lehetővé tette.

A vizsgálatainkban elsősorban Magyarországról származó izolátumok szerepeltek. Bár ez a tény bizonyos mértékben limitálhatja a kidolgozott rendszer hatékonyságát, a magyar törzsek pontos elkülönítése – legyen szó földrajzi elhelyezkedésről, időbeni távolságról vagy egy integrációba tartozásról – jól mutatja a kidolgozott séma nagy felbontóképességét és robusztusságát.

Az I-es klaszter törzsei különböző integrációkból származtak, ezeknél a rendszer elsősorban földrajzi elhelyezkedés alapján csoportosította a törzseket, emellett

**Elsőként írtak le
M. anserisalpingitidis
fajt célzó maggenom-
MLST rendszert**

a több éves időbeli eltérés a törzsek kimutatásában szintén jelentős genetikai különbségeket eredményezett (MYCAV36 [Hajdúböszörmény, 2012, lúd kloákatampon] és MYCAV512 [Hajdúböszörmény, 2018, lúd kloáka] között 6 év, ill. a MYCAV56 [Sükösd, 2013, lúd phallus], 63 [Sükösd, 2013, lúd tracheatampon], 71 [Sükösd, 2014, lúd phalluslympha], 73 [Sükösd, 2014, lúd kloákatampon], 77 [Sükösd, 2014, lúd phalluslympha], 78 [Sükösd, 2014, lúd trachea] és MYCAV452 [Sükösd, 2018, lúd kloáka] között is 4–5 év különbség van).

A II-es klaszter tagjai egy integrációba tartoztak, közöttük kisebb genetikai variabilitás figyelhető meg, azonban a földrajzi eredetet tekintve nagyobb a változatosság a törzsek között. Az állományok gyakori szállítása vagy azonos származása magyarázat lehet erre a jelenségre. Ezt a feltételezést támasztja alá, hogy a klaszterbe sorolt törzsek elsősorban izolálás ideje alapján csoportosultak (a szubkládok tagjai között általánosságban 1–2 év különbség figyelhető meg). A gyakori szállítás megnehezíti a patogénmentes állományok fenntartását, ill. hozzájárulhat egy aktív fertőzés terjedéséhez és a mentes állományok fertőződéséhez.

Érdemes kiemelni, hogy az I-es klaszterbe tartozó törzsek között megtalálható 5 törzs (zölddel jelölve) különálló szubkládot képez, emellett fenotípusosan (amit egy másik kutatásban vizsgáltunk) is jelentősen eltérnek a többi törzstől. Az öt törzsből három Távol-Keletről származik (Kína és Vietnám), kettő pedig Magyarországról. Későbbi vizsgálataink során még alaposabban sikerült feltérképeznünk a törzsek különbözőségének mértékét, amely nemcsak genetikai szinten jelenik meg, de metabolikus különbség is megfigyelhető volt közöttük [23]. A cgMLST séma alapján létrehozott filogenetikai fa segítségével az atípusos törzsek egyértelműen elkülönültek a többi törzstől, az általunk alkotott alcsoport jól azonosítható volt.

Bár a vizsgálatot időigényes teljes genom szekvenálás előzte meg, a hagyományos MLST primertervezési és validálási lépéseinek hiánya, valamint a teljes genom szekvenálás elérhetőségének, költségeinek csökkenése ellensúlyozza ezt. Ehhez hozzájárul, hogy a hagyományos MLST módszerhez is szükséges szekvenálás (minden egyes génre, amit a módszerben alkalmaznak). Kiemelendő, hogy mivel a *M. anserisalpinitidis* gyorsan növekvő baktérium, táplevesbe oltás után napokban mérhető a törzs növekedése. Ez a gyors növekedés lehetővé teszi a módszer diagnosztikában történő használatát is, amely nehezebb egy olyan lassan növekedő faj esetén, mint pl. a *M. hyopneumoniae*.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Munkánkat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal KKP19 (129751) és TKP2021-EGA-01 pályázata, az Eötvös Loránd Kutatási Hálózat SA-27/2021 pályázata, az RRF-2.3.1-21-2022-00001 számú projekt a Helyreállítási és Ellenállóképességi Eszköz és Nemzeti Helyreállítási Alapból nyújtott támogatásával, az RRF-2.3.1-21 pályázati program, valamint a MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíja és az Emberi Erőforrások Minisztériuma Új Nemzeti Kiválóság Programjának Bolyai+ Ösztöndíja támogatták. Az Innovációs és Technológiai Minisztérium Kooperatív Doktori Program Doktori Hallgatói Ösztöndíj Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

IRODALOM

1. Stipkovits L, Varga Z, Dobos-Kovacs M, Santha M (1984) Biochemical and serological examination of some *Mycoplasma* strains of goose origin. *Acta Vet Hung* 32:117–125
2. Gyuranecz M, Mitter A, Kovács ÁB, Grözner D, Kreizinger Z, Bali K, Bányai K, Morrow CJ (2020) Isolation of *Mycoplasma anserisalpinitidis* from swan goose (*Anser cygnoides*) in China. *BMC Vet Res* 16:178. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02393-5>
3. Grözner D, Kovács ÁB, Wehmann E, Kreizinger Z, Bekő K, Mitter A, Sawicka A, János S, Tomczyk G, Morrow CJ, Bányai K, Gyuranecz M (2021) Multilocus sequence typing of the goose pathogen

A cgMLST séma alapján létrehozott filogenetikai fa segítségével az atípusos törzsek egyértelműen elkülönültek a többi törzstől

- Mycoplasma anserisalpingitidis*. Vet Microbiol 254:108972. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108972>
4. Sprygin AV, Volokhov DV, Irza VN, Drygin VV (2012) Detection and genetic identification of *Mycoplasma* sp. 1220 in geese in the Russian Federation and Ukraine. Agric Biol 87–95. <https://doi.org/10.15389/AGROBIOLOGY.2012.2.87ENG>
 5. Volokhov DV, Gróznér D, Gyuranecz M, Ferguson-Noel N, Gao Y, Bradbury JM, Whittaker P, Chizhikov VE, Szathmary S, Stipkovits L (2020) *Mycoplasma anserisalpingitidis* sp. nov., isolated from European domestic geese (*Anser anser domesticus*) with reproductive pathology. Int J Syst Evol Microbiol 70:2369–2381. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004052>
 6. Gróznér D, Sulyok KM, Kreizinger Z, Rónai Z, Jánosi S, Turcsányi I, Fülöp Károlyi H, Kovács ÁB, Kiss MJ, Volokhov D, Gyuranecz M (2019) Detection of *Mycoplasma anatis*, *M. anseris*, *M. cloacale* and *Mycoplasma* sp. 1220 in waterfowl using species-specific PCR assays. PLoS One 14:e0219071. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219071>
 7. Sawicka-Durkalec A, Kursá O, Bednarz Ł, Tomczyk G (2021) Occurrence of *Mycoplasma* spp. in wild birds: phylogenetic analysis and potential factors affecting distribution. Sci Rep 11:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96577-0>
 8. Sawicka-Durkalec A, Tomczyk G, Kursá O, Stenzel T, Gyuranecz M (2022) Evidence of *Mycoplasma* spp. transmission by migratory wild geese. Poult Sci 101:101526. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101526>
 9. Dobos-Kovács M, Varga Z, Czifra G, Stipkovits L (2009) Salpingitis in geese associated with *Mycoplasma* sp. strain 1220. Avian Pathol 38:239–243. <https://doi.org/10.1080/03079450902912127>
 10. Stipkovits L, Kempf I (1996) Mycoplasmoses in poultry. Rev Sci Tech 15:1495–1525
 11. Stipkovits L, Szathmary S (2012) Mycoplasma infection of ducks and geese. Poult Sci 91:2812–2819. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02310>
 12. Stipkovits L (1979) The Pathogenicity of Avian Mycoplasmas Die Pathogenität von Gefügelmycoplasmen. Zentralblatt für Bakteriell Parasitenkunde, infektiionskrankheiten und Hygiene 1:171–183
 13. Gróznér D, Kreizinger Z, Sulyok KM, Rónai Z, Hrivnák V, Turcsányi I, Jánosi S, Gyuranecz M (2016) Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma* sp. 1220 strains isolated from geese in Hungary. BMC Vet Res 12:1–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0799-0>
 14. Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG (1998) Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci U S A 95:3140–3145. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3140>
 15. Urwin R, Maiden MCJ (2003) Multi-locus sequence typing: A tool for global epidemiology. Trends Microbiol 11:479–487. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.08.006>
 16. Gróznér D, Forró B, Kovács ÁB, Marton S, Bányai K, Kreizinger Z, Sulyok KM, Gyuranecz M (2019) Complete Genome Sequences of Three *Mycoplasma anserisalpingitis* (*Mycoplasma* sp. 1220) Strains. Microbiol Resour Announc 8:e00985–19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00985-19>
 17. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin A V., Sirotkin A V., Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA (2012) SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol 19:455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
 18. Silva M, Machado MP, Silva DN, Rossi M, Moran-Gilad J, Santos S, Ramirez M, Carriço JA (2018) chewBBACA: A complete suite for gene-by-gene schema creation and strain identification. Microb genomics 4:1–7. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000166>
 19. Zhou Z, Alikhan NF, Sergeant MJ, Luhmann N, Vaz C, Francisco AP, Carriço JA, Achtman M (2018) Grapetree: Visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. Genome Res 28:1395–1404. <https://doi.org/10.1101/gr.232397.117>
 20. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4:406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
 21. Woese CR, Maniloff J, Zablen LB (1980) Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. Proc Natl Acad Sci U S A 77:494–498. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.1.494>
 22. Delaney NF, Balenger S, Bonneaud C, Marx CJ, Hill GE, Ferguson-Noel N, Tsai P, Rodrigo A, Edwards S V. (2012) Ultrafast evolution and loss of CRISPRs following a host shift in a novel wildlife pathogen, *Mycoplasma Gallisepticum*. PLoS Genet 8:e1002511. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002511>
 23. Kovács ÁB, Wehmann E, Gróznér D, Bali K, Nemessházi E, Hrivnák V, Morrow CJ, Bányai K, Kreizinger Z, Gyuranecz M (2023) Characterization of atypical *Mycoplasma anserisalpingitidis* strains. Vet Microbiol 280:109722. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2023.109722>

Közlésre érck.: 2023. júl. 12.