Ph.D.értekezés tézisei

Vízibaromfi *Mycoplasma* fajok bioinformatikai vizsgálata

Kovács Áron Botond

Témavezető: Dr. Miklós Gyuranecz

Állatorvostudományi Egyetem

Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2025

Témavezető:

.....

Miklós Gyuranecz, Ph.D.

HUN-REN Állatorvostudományi Kutatóintézet

témavezető

.....

Áron Botond Kovács

1. Bevezetés

A *Mycoplasma anserisalpingitidis* és a *Mycoplasma anatis* kiemelt fontossággal bírnak vízimadarakra gyakorolt hatásaik miatt, mind gazdasági, mind ökológiai szempontból nézve. A *M. anserisalpingitidis* fajt először Magyarországon, izolálták, lúdból 1983-ban, míg a *M. anatis* először az Egyesült Királyságban 1964-ben egy orrmelléküreg-gyulladás járvány során. Az egészséges és beteg madarakból történő gyakori izolálás, valamint kísérletes vizsgálatok alapján feltételezhető a *M. anserisalpingitidis* és a *M. anatis* opportunista jellege. Előbbit leggyakrabban háziludakból, utóbbit elsősorban vad és házi kacsákból izolálják. A vízimadarakban előforduló Mycoplasma-fertőzések horizontálisan és vertikálisan is terjedhetnek. A *M. anserisalpingitidis* által okozott fertőzések gyakran a

phallus gyulladását eredményezik, ami nekrózishoz és funkcióromláshoz vezethet, míg az *M. anatis* fertőzés során fibrinnel fedett légzsákok és szívburok, hashártyagyulladás, vérbőség és enyhe ödéma figyelhető meg a tüdőkben.

A *Mycoplasma* fajok általában kompakt genommal rendelkeznek. A korlátozott genomméret, bizonyos DNS-javító mechanizmusok hiányával párosulva, magasabb mutációs rátához vezethet. A teljes genom szekvenálás lehetőséget nyújt ezen baktériumok genomi jellemzőinek mélyebb megértésére, amely megbízhatóbb diagnosztikai módszerekhez vezethet. Számos, teljes genom vizsgálaton alapuló módszer létezik, például az átlagos nukleotid-azonosság (Average nucleotide identity – ANI), az átlagos aminosav-azonosság

(average amino acid identity – AAI), a mag genom multlókusz szekvenciatipizálás (core genome multi-locus sequence typing – cgMLST), valamint a teljes genomon alapuló asszociációs vizsgálat (Genome wide association study – GWAS). Az ANI elemzés során a genomszekvenciák közötti átlagos nukleotid azonosságot számítjuk ki, míg az AAI ugyanilyen elven működik, de aminosavakra alapozva. A GWAS statisztikai módszereket alkalmaz a genotípusok és fenotípusok közötti korrelációk kimutatására, teljes genomszekvenciák felhasználásával. Számos módszer áll rendelkezésre profágok keresésére, leginkább adatbázisfüggő vagy független *in silico* eszközökkel.

2. Célkitűzések

Az értekezés célkitűzései :

Ad 1. egy olyan mag genomot célzó multilókusz szekvencia-tipizálási séma létrehozása, amely a *M. anserisalpingitidis* törzseket vizsgálja

Ad 2. A *M. anserisalpingitidis* faj genetikai és fenotípusos variabilitásának vizsgálata a fajon belüli eltérések feltérképezése végett.

Ad 3. A *M. anserisalpingitidis* törzsek antibiotikum rezisztenciájának genetikai hátterének feltérképezése GWAS módszerrel.

Ad 4. A *M. anserisalpingitidis* és a *M. anatis* fajok közötti potenciális horizontális géntranszfer események feltérképezése, különös tekintettel a profág-jellegű szekvenciákra

3. Anyag és módszertan

Szekvenálás és *de novo* genom összeillesztés

A törzsek DNS-ét 10 ml logaritmikus fázisban lévő tápleveses kultúrából vontuk ki a QIAamp DNA Mini kit (Qiagen Inc., Hilden, Németország) használatával a gyártó utasításait követve. A nukleotidszekvenciákat a gyártó protokollja alapján Illumina® NextSeq 500 szekvenáló készülékkel (Illumina, San Diego, CA, USA) határoztuk meg. A rövid leolvasások (short reads) minőségellenőrzését a FastQC szoftverrel végeztük el. Minden törzshöz vázlatos genomszekvenciát (draft genome) készítettünk a SPAdes szoftver segítségével, alapértelmezett paraméterekkel. A vázlatos genom kontigjait az ATCC BAA-2147 törzs referenciájával, a MAUVE algoritmus segítségével rendeztük, majd

azokat az NCBI Prokaryote Genome Annotation Pipeline segítségével annotáltuk.

Mag genomot célzó multilókusz szekvencia-tipizálás

A cgMLST séma létrehozása érdekében először egy *wgMLST* (whole-genome MLST) sémát készítettünk, amely az összes CDS-t (coding DNA sequence) tartalmazta. Ezt a sémát a chewBBACA szoftver használatával hoztuk létre. Ezután kiszűrtük a paralóg allélokat a cgMLST séma létrehozásához, a szokásos 95%-os jelenléti küszöböt alkalmazva.

A wgMLST sémát a „CreateScheme” művelettel hoztuk létre, majd az „AlleleCall” művelet során, előállítottuk a cgMLST sémát, amely csak a törzsek többségében megtalálható allélokat tartalmazta. Végül a cgMLST sémát az „ExtractCgMLST” művelettel megadtuk a szekvencia típus számokat.

Az atípusos *M. anserisalpingitidis* törzsek genomi és fenotípusos jellemzése

Fenotípusos karakterizálás

Öt *M. anserisalpingitidis* törzs (MYCAV61, MYCAV93, MYCAV783, MYCAV785 és MYCAV903) jelentős genomi eltérést mutatott a többi törzshöz képest. Az összehasonlításhoz további öt törzset (ATCC BAA-2147, MYCAV34, MYCAV47, MYCAV512 és MYCAV667) választottunk, mint kontrollcsoport. Az atípusos törzsek jellemzésére az alábbi fenotípusos tulajdonságokat választottuk: hőmérséklet-preferencia, szénhidrát-hasznosítás (glükóz és fruktóz); arginin, karbamid és piruvát hasznosítása. A hagyományos (V1 jelölt) tápközeg mellett további hét, ezen alapuló tápközeget (V2–V8) készítettünk, összesen nyolcat. A tápközegek vagy glükózt (V1–V4), vagy fruktózt (V5–V8), arginint (V1,

V2, V5, V6), karbamidot (V3, V4, V7, V8) és piruvátot (V1, V3, V5, V7) tartalmaztak. A vizsgálatokat két hőmérsékleten (33 és 37 °C) végeztük. Az eredményeket Kolmogorov–Szmirnov statisztikai teszttel értékeltük az R szoftver segítségével.

Növekedésgátlási vizsgálat

Az öt atipikus törzs, az öt kontroll törzs, valamint a *M. anatis* típus törzs (NCTC 10156) növekedésgátlási tesztnek lett alávetve, *anti-M. anserisalpingitidis* hiperimmun nyúl szérummal. A vizsgálathoz 20 µl „futócsepp” *M. anserisalpingitidis* kultúrát (10^4 CCU/ml hígításban) vittünk fel 7 ml Mycoplasma szilárd táptalajt tartalmazó Petri-csészékre. A felszívódást követően minden futócseppre egy-egy antimikrobiális érzékenységi korongot helyeztünk, melyet 20 µl hiperimmun szérummal itattunk át. A

vizsgálatot 5%-os CO_2-szinten egy napig 33 °C-on, majd további két napig 37 °C-on inkubáltuk. A korongok körüli gátlási zónákat tíz napon át naponta, mikroszkóppal ellenőriztük.

A törzsek 16S, ITS és 23S rRNS, valamint háztartási gének összehasonlító elemzése

A törzsek 16S rRNS, ITS régió és 23S rRNS szekvenciáit összefűztük és a MAFFT algoritmus segítségével illesztettük. A filogenetikai fát az illesztés alapján a MEGA-X szoftverrel állítottuk elő, Maximum Likelihood módszerrel, a General Time Reversible modell és gamma eloszlás (GTR+G) alkalmazásával, 1000 bootstrap ismétléssel.

A vizsgálatba az alábbi háztartási géneket vontuk be: *dnaE, fusA, parC, pyk, rpoB, rpoC, rpoD, topA*, *uvrA*, *atpB, ileS, secY, tig* és *uvrD*. A gének szekvenciáit

összefűztük és MAFFT-tel illesztettük, majd Maximum Likelihood filogenetikai fát készítettünk MEGA-X szoftverrel, GTR+G+I modellel (gamma eloszlás és invariáns helyek), 1000 bootstrap imsétléssel.

A törzsek átlagos nukleinsav egyezés (ANI) és átalagos aminosav egyezés (AAI) vizsgálat

A genomi átlagos nukleinsav egyezés (ANI) elemzésére a FastANI szoftvert használtuk. Az ANI elemzést mind fajon belül, mind fajok között elvégeztük; az utóbbihoz *M. anatis* törzseket is felhasználtunk. Az AAI értékek kiszámításához a törzsek kódoló DNS szekvenciáit lefordítottuk fehérjeszekvenciákra, majd az Environmental Microbial Genomics Laboratory AAI eszközével végeztük az elemzést, 50 törzsre korlátozva (az 5

atipikus, a referenciatörzs és 44 véletlenszerűen kiválasztott törzs) a szoftveres limitáció miatt.

A *M. anserisalpingitidis* és *M. anatis* törzsek közötti horizontális géntranszfer vizsgálat

Mind a *M. anserisalpingitidis* és *M. anatis* törzsek genomjait megvizsgáltuk lehetséges horizontális géntranszfer eseményekre az IslandCafe szoftver segítségével. Ez az eszköz úgynevezett genomi szigeteket keres, amelyek jó indikátorai lehetnek a korábbi HGT eseményeknek, és összevethetők a profágszerű szekvenciák keresésének eredményeivel, azok eredményeit kiegészítve.

Teljes genomon alapuló asszociációs vizsgálat

Antibiotikumok

A törzsgyűjtemény antibiotikum-érzékenységi vizsgálatát kilenc antimikrobiális szerrel szemben végeztük el: tiamulin, oxitetraciklin, doxiciklin, tilozin, tylvalosin, tilmikozin, linkomicin, spektinomicin és enrofloxacin. Az antibiotikumok hígítását és tárolását, a tápleves mikrohigításos vizsgálatokat, valamint a minimális gátló koncentrációk (MIC) meghatározását. A tenyészthető mycoplasma sejtek számát meghatároztuk és egységesen 10^4 CCU/ml-re hígítottuk. A vizsgálatokhoz Mycoplasma tápleves közeget használtunk, minden 96 lyukú mikrotiterlemez tartalmazott növekedési kontrollokat (tápleves közeg és mycoplasma inokulum antibiotikum nélkül), negatív kontrollokat (csak

tápleves közeg, antibiotikum és mycoplasma nélkül), valamint pH kontrollokat (pH 6,8-ra beállított tápleves közeg). A MIC értékeket azon legalacsonyabb antimikrobiális koncentrációként határoztuk meg, amelynél sem pH-, sem színváltozást nem lehetett megfigyelni. Az antibiotikumokat a következő MIC tartományokban alkalmaztuk: 0,25–64 µg/ml (tilozin, tylvalosin, tilmikozin, linkomicin, oxitetraciklin és spektinomicin), 0,039–10 µg/ml (doxiciklin, enrofloxacin és tiamulin).

Genotípus – fenotípus asszicációs vizsgálat és promóter mappelés

A genotípus és fenotípus közötti asszociáció vizsgálatát a pyseer eszközzel végeztük. A törzsek közötti genetikai távolságot a cgMLST séma alapján számítottuk ki. A k-mer-eket a *fsm-lite* szoftverrel

határoztuk meg. A GWAS elemzést a pyseer szoftver dokumentációjában megadott legjobb gyakorlat szerint hajtottuk végre, felhasználva: a MIC értékeket tartalmazó fenotípusos fájlt, cgMLST sémán alapuló távolságmátrixot, és a *fsm-lite* által előállított k-mer fájlt. A törzsek közötti genetikai hasonlóság és rokonság pontosabb figyelembevételére lineáris kevert modell került alkalmazásra. Az asszociációs vizsgálatot kilencszer ismételtük meg, mindegyik antibiotikumra külön-külön. Mivel a többszörös statisztikai tesztelés p-érték inflációt okozhat, a genom szintű vizsgálatokban szigorúbb küszöböt alkalmaztunk: $p < 5 \times 10^{-8}$.

Profág jellegű szekvenciák a *M. anserisalpingitidis* és *M. anatis* törzsekben

A profág szekvenciák keresését, egy előzetes vizsgálat előzte meg, melyet két lépésben hajtottunk végre: elsőként PHASTER, PhiSpy és Prophage Hunter eszközökkel, majd másodlagos keresést végeztünk a hosszúság szerint szűrt PhiSpy eredményeken, ez utóbbit PHASTER és Prophage Hunter szoftverekkel.

Egy új megközelítést is használtunk, a VIBRANT szoftvert. Ez az eszköz az annotációkat elemzi, és összeveti a Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), a Pfam és a Virus Orthologous Groups (VOG) adatbázisokkal. Ebben a lépésben *M. anatis* törzseket is bevontunk annak érdekében, hogy megállapítsuk, a feltételezett profágok ebben a

közeli rokon fajban is jelen vannak-e. A VIBRANT szoftver által talált profág-jellegű szekvenciákat a megfelelő draft genomokhoz illesztettük, majd más törzsek genomjaihoz is, a Geneious Prime szoftverrel. A BRIG (BLAST Ring Image Generator) eszközt használtuk a 10 000 bp-nél hosszabb feltételezett profágok elemzésére, az előzőleg MeDuSa segítségével összeállított *M. anserisalpingitidis* MYCAV270 törzs genomjához illesztve.

4. Eredmények

Szekvenálás és *de novo* genom összeillesztés

A vizsgálatban 110 *M. anserisalpingitidis* törzset használtunk, amelyekből 110 ún. draft genom készült. Az összeállításokban a leghosszabb kontigok átlagosan 96 619 bp hosszúak voltak; az

átlagos Phred-minőségi érték 35,4 volt, a rövid leolvasások átlagos száma pedig 4 753 178 darab.

Mag genomot célzó multilókusz szekvencia-tipizálás

A chewBBACA segítségével a teljes CDS-készletből kivont cgMLST séma 540 CDS-t tartalmazott 95%-os jelenléti küszöbbel. Az azonos integrációból származó törzsek egy csoportba sorolódtak a filogenetikai fán; azonban az I. klaszter három olyan törzset is tartalmazott (MYCAV47, MYCAV49 és MYCAV69), amelyek nem tartoztak az integrációhoz. A II. klaszter sokkal változatosabb földrajzi és időbeli háttérrel rendelkező törzseket foglalt magában. Mindkét klaszter esetében megfigyelhető volt összefüggés a törzsek cgMLST profiljai és azok földrajzi eredete, valamint az izolálás ideje között. Az ugyanazon állat különböző szerveiből izolált törzsek

is jelentős hasonlóságot mutattak cgMLST profiljukban.

Az atípusos *M. anserisalpingitidis* törzsek genomi és fenotípusos jellemzése

Fenotípusos karakterizálás

Statisztikailag szignifikáns különbségek voltak megfigyelhetők az atipikus és a kontrolltörzsek között a növekedési sebesség alapján ($p = 0,0086$, $D = 0,25$). Az ötnapos növekedés során a kontrolltörzsek nagyobb értékeket értek el az atípusoshoz képest. Minden törzs 37 °C hőmérsékletet preferált. A fruktóztartalom korlátozó tényezőként hatott a növekedésre, mivel minden törzs esetében később következett be savas színváltozás – kivéve ATCC BAA-2147 és MYCAV512 törzsek esetében 33 °C-on. Egyetlen atípusos törzs sem nőtt 33 °C-on

fruktóztartalmú tápközegben, vagy csak nagyon lassan (kivéve MYCAV61).

Növekedésgátlási vizsgálat

A növekedésgátlási vizsgálat során a kontrollcsoport törzseinél az átlagos gátlási zónatávolság 5,850 mm volt. Ezen belül a MYCAV34 esetében 5,669 mm, a MYCAV47-nél 6,437 mm, a MYCAV512-nél 5,157 mm, a MYCAV667-nél 6,138 mm, míg az ATCC BAA-2147 törzsnél 4,669 mm-es gátlási zónát mértünk. Az atípusos törzsek esetében ez az érték átlagosan 3,364 mm volt. A különálló törzsek közül a MYCAV61 5,401 mm, a MYCAV93 2,728 mm, a MYCAV783 2,564 mm, a MYCAV785 4,912 mm, míg a MYCAV903 3,172 mm gátlási zónát mutatott. Összehasonlításképp, a *M. anatis* típus törzsnél

(NCTC 10156) mért zónaátmérő mindössze 1,408 mm volt.

A törzsek 16S, ITS és 23S rRNS, valamint háztartási gének összehasonlító elemzése

Minden *M. anserisalpingitidis* törzs egy klasztert alkotott, és az atípusos törzsek ezen belül is elkülönült csoportot képeztek. A *M. anatis* típus törzs külön ágat alkotott, az atípusos törzsek azonban még mindig a *M. anserisalpingitidis* ágon belül maradtak, de jól elkülöníthetők voltak.

A törzsek átlagos nukleinsav egyezés (ANI) és átalagos aminosav egyezés (AAI) vizsgálat

Egyértelmű gradiens szerű eloszlást figyeltünk meg a teljes törzsgyűjteményben: nemcsak az öt atípusos törzs és a többi törzs között, hanem a „fő” gyűjteményen belül is. Az atípusos törzsek nem érték

el azt a küszöbértéket, amely alapján ugyanazon fajhoz tartoznának (94–95% ANI). A *M. anatis* törzsek csupán ~85%-os azonosságot mutattak a *M. anserisalpingitidis* mintákkal – jól szemléltetve a két faj különbözőségét. Az AAI elemzés megerősítette az ANI eredményeket, de az eltérések kisebbek voltak a kódoló régiókon belüli szinoním mutációk miatt.

A *M. anserisalpingitidis* és *M. anatis* törzsek közötti horizontális géntranszfer vizsgálat

Az IslandCafe eszközt használtuk mind *M. anserisalpingitidis*, mind *M. anatis* törzsek genomjainak vizsgálatára potenciális horizontális géntranszfer események kimutatása céljából. Az eszköz genomi szigeteket keres a genomokon belül, amelyek jó indikátorai lehetnek korábbi HGT

eseményeknek, és összevethetők a profágszerű szekvenciák keresésének eredményeivel, illetve azokat tovább bővíthetik.

Mag genomot célzó multilókusz szekvenciatipizálása a *M. anserisalpingitidis* és *M. anatis* törzseknek

A séma 105 allélt tartalmazott, amelyek mindegyike jelen volt a *M. anatis* és *M. anserisalpingitidis* törzsek genomjainak 95%-ában. A két faj külön ágat alkotott, és az atipikus törzsek a többi *M. anserisalpingitidis* törzssel klasztereződtek. Az egyesített cgMLST elemzésből származó filogenetikai fa megerősítette az ANI, AAI és a háztartási gének elemzésének eredményeit.

Teljes genomon alapuló asszociációs vizsgálat

A három vizsgált makrolid közül (tilozin, tilmikozin és tylvalosin) a tylvalosin mutatta a legalacsonyabb MIC_{50} értéket (0,5 µg/ml) és MIC_{90} értéket (2 µg/ml) a törzsekkel szemben. A tilmikozin és tilozin MIC értékei széles tartományban mozogtak (≤0,25–>64 µg/ml), a MIC_{50} érték 16 µg/ml, a MIC_{90} érték pedig ≥64 µg/ml volt. A tilmikozin esetében különösen magas MIC_{50} és MIC_{90} értékeket jegyeztünk fel (mindkettő ≥64 µg/ml). A linkomicin MIC értékei a MIC_{50} érték (2 µg/ml) köré csoportosultak, noha egy izolátum esetében emelkedett MIC érték (>64 µg/ml) volt megfigyelhető. A mérési tartomány 0,25–>64 µg/ml volt, a MIC_{90} pedig 4 µg/ml. A tetraciklinek esetében jelentősen széles MIC tartományokat figyeltünk meg: oxitetraciklin esetében ≤0,25–64

µg/ml, doxiciklin esetében ≤0,039–>10 µg/ml. A hozzájuk tartozó MIC_{50} értékek különösen magasak voltak (16, illetve 5 µg/ml), akárcsak a MIC_{90} értékek (64, illetve 10 µg/ml). A spektinomicin MIC_{50} értéke 8 µg/ml volt, de a törzsek jelentős részénél ennél magasabb értékeket figyeltünk meg; a tartomány 4–>64 µg/ml, a MIC_{90} érték 16 µg/ml. Az enrofloxacin MIC értékei is széles tartományban mozogtak (0,312–10 µg/ml), a MIC_{50} érték 5 µg/ml, a MIC_{90} pedig 10 µg/ml volt. A tiamulin szintén széles MIC tartományt mutatott (0,156–2,5 µg/ml), a MIC_{50} érték 0,625 µg/ml, a MIC_{90} érték 2,5 µg/ml volt.

A pyseer elemzés különböző számú szignifikáns k-mert (p-érték ≤ 5×10^{-8}) talált kilencből öt antimikrobiális szer esetében. A makrolidok közül tilmikozinra és tylvalosinra a szoftver 92, illetve 727

k-mert talált, ugyanakkor tilozin esetében nem detektált szignifikáns k-mereket. A linkomicin esetében az eszköz 1173 szignifikáns k-mert azonosított. Sem oxitetraciklinre, sem doxiciklinre nem találtunk szignifikáns k-mereket. A spektinomicin esetében 109, enrofloxacin esetében pedig 436 szignifikáns k-mert detektáltunk. A tiamulin rezisztenciával összefüggésben nem volt szignifikáns k-mer megfigyelhető. A Promotech 3437 promótert talált az ATCC BAA-2147 típus törzs genomjában.

Profág jellegű szekvenciák a *M. anserisalpingitidis* és *M. anatis* törzsekben

A PHASTER szoftverrel végzett elsődleges keresés profág-szerű jellemzőkkel rendelkező szekvenciákat talált az összes törzsben, ugyanakkor ezek az

eredmények alacsony pontszámot mutattak (10 és 40 között). A PhiSpy szoftver szintén kimutatott profág-szerű szekvenciákat minden annotált draft genomban, kivéve a MYCAV39, MYCAV94 és MYCAV218 törzseket. A Prophage Hunter szoftver minden szekvencia esetében pozitív találatot adott, azonban csak a MYCAV34, MYCAV77, MYCAV202 és MYCAV670 törzsek tartalmaztak olyan profág-szerű szekvenciákat, amelyeket *Mycoplasma* profágként azonosítottak. Minden módszer arra utalt, hogy a vizsgált törzsek profágokat tartalmazhatnak, de az eredmények között nem volt jelentős átfedés.

Emiatt, egy új megközelítést alkalmaztunk: A VIBRANT szoftvert választottuk, mint új módszert a törzsekben előforduló potenciális, új profágok további vizsgálatához. Ez az eszköz 77 vizsgált törzs

közül 37-ben talált profág-szerű szekvenciákat. Az eredmények hosszúsága 1870 és 59948 bp között változott. Mivel a 10 000 bázispárnál rövidebb szekvenciák vélhetően nem tekinthetők teljes profágoknak, csak azokat a profág-szerű szekvenciákat elemeztük tovább, amelyek ezt a hosszt meghaladták. Ezeknek a szekvenciáknak a feltérképezése (n = 31) azt mutatta, hogy ezek valószínűleg intakt profág-szerű régiók, és nem töredezett profágok részei az adott törzsek genomjában.

A 31 feltételezett profágból 22 jelentős hasonlóságot mutatott a *M. anatis* NCTC 10156 törzsével, a CDS-ek nukleotid BLAST keresése alapján (lefedettsés 57,00–100,00% és azonosság 90,98–93,52% között). Tíz *M. anatis* törzset is megvizsgáltunk a

VIBRANT szoftverrel annak ellenőrzésére, hogy ezek a profág-szerű szekvenciák jelen vannak-e más vízimadár *Mycoplasma* fajokkban is. A VIBRANT négy *M. anatis* törzsben talált feltételezett profágokat, ezek közül három átfedést mutatott a MYCAV270 törzsben azonosított profág-szerű szekvenciákkal.

5. Megbeszélés

Mag genomot célzó multilókusz szekvencia-tipizálás

A kifejlesztett cgMLST séma 540 CDS-ből állt, ami az *M. anserisalpingitidis* ATCC BAA-2147 típus törzs CDS-készletének körülbelül 68,87%-át tette ki. Ez a séma olyan szekvenciatipizálási eljárást eredményezett, amely nemcsak az összes vizsgált törzset képes volt megkülönböztetni, hanem olyan alegységekbe is sorolta őket, amelyek jelentős

összefüggést mutattak a minták metaadataival. A wgMLST és cgMLST alapú filogenetikai fák jelentős hasonlóságot mutattak, ami arra utal, hogy a maggenomi sémánk elég robusztus ahhoz, hogy további vizsgálatok alapjául szolgáljon.

Az a megfigyelés, miszerint ugyanazon integrációhoz tartozó törzsek (II. klaszter) nagyobb változatosságot mutattak, és nem volt kimutatható összefüggés a genotípus és a földrajzi eredet között, arra utalhat, hogy a gazdafajok közötti mozgás gyakori, vagy hogy a különböző helyről származó állatok között érintkezés történhetett. A jelentős számú magyarországi minta arra utal, hogy a fertőzés elterjedt lehet a Kárpát-medencében; ugyanakkor a lengyel, svéd és kínai minták jelenléte azt mutatja, hogy a mikroorganizmus világszerte

előfordulhat. Mivel Kína a világ vezető lúdtermelője, különösen fontos lenne az *M. anserisalpingitidis* fertőzés előfordulásának vizsgálata ezen a területen.

Az atípusos *M. anserisalpingitidis* törzsek genomi és fenotípusos jellemzése

Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy a prokarióta fajok között léteznek jól elkülöníthető genetikai határok, ugyanakkor bár a baktériumfajok rendszertanilag osztályozhatók, ezek a határok valószínűleg fajról fajra különböznek. Az ANI és AAI elemzések eredményei egyaránt fokozatos eltérést mutattak mind a nukleotid-, mind az aminosav-azonosság terén, ami arra utal, hogy az eltérő helyekről származó atípusos törzsek inkább egymáshoz álltak közelebbi rokonságban, mint a gyűjtemény többi tagjával. Az atípusos *M. anserisalpingitidis* törzsek valamivel a fajhatár alá

estek, azonban ez az eltérés csekély mértékű volt – legfeljebb néhány százalékpontnyi (maximum 0,6%). A vizsgálatban szereplő öt atípusos törzset eltérő földrajzi helyekről izoláltuk: Kínából, Vietnámból és Magyarországról. A gazdafajok szintén változatosak voltak: a minták hattyúlúdból és házilúdból származtak, valamint eltérő szervekből kerültek izolálásra, köztük a kloákából, ivarszervből és annak nyirokcsomóiból.

Teljes genomon alapuló asszociációs vizsgálat

Az antimikrobiális rezisztencia többféle módon kialakulhat, ideértve az efflux pumpák fokozott működését, az antibiotikumok támadáspontjainak megváltoztatását (például a makrolidok esetében, mint a tilmikozin, tilozin és tylvalosin), vagy az

antibiotikumok felvételének csökkenését (például az aminoglikozidokkal, mint a spektinomicin szemben). Különböző transzferázok — különösen metiltranszferázok — gyakran mutatnak szignifikáns összefüggést többféle antimikrobiális szerrel szembeni csökkent érzékenységgel. Ezen túlmenően a DNS giráz B alegysége, a DNS topoizomeráz IV A alegysége, valamint efflux pumpa alegységek is szignifikáns asszociációt mutattak. Ez összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy egyes transzferázok kulcsfontosságú szerepet játszhatnak az antibiotikum-rezisztenciában. A második leggyakoribb CDS típus, amely szignifikáns találatot adott, olyan géneket tartalmazott, amelyek efflux pumpák tagjai voltak, vagy efflux pumpa aktivitást mutattak. A baktériumok hatékonyan

képesek megvédeni magukat számos antimikrobiális szer ellen azáltal, hogy fokozzák efflux aktivitásukat; ez, ha a csökkent bejutással társul, jelentősen csökkenti az antibiotikum sejten belüli koncentrációját.

Profág jellegű szekvenciák a *M. anserisalpingitidis* és *M. anatis* törzsekben

A *M. anserisalpingitidis* törzsekben azonosított 31 feltételezett profág közül 22 jelentős hasonlóságot mutatott a *M. anatis* NCTC 10156 törzzsel. Mindössze öt profág-szerű szekvencia mutatott nagyobb hasonlóságot bármely más *M. anserisalpingitidis* törzzsel, mint a *M. anatis* NCTC 10156 típustörzzsel. Az *M. anserisalpingitidis* mag genomot célzó vizsgálata során megállapítottuk, hogy mindössze öt profág CDS volt jelen a

maggenomban, és ezek mind megtalálhatók voltak a MYCAV669 törzsben, ami arra utal, hogy a többi profág-szerű szekvencia az járulékos genomhoz tartozik.

Három *M. anatis* törzs (MYCAV786, MYCAV787, MYCAV788) körülbelül 90%-os hasonlóságot mutatott az átfedő régiókban a *M. anserisalpingitidis* MYCAV270 törzs egyik profág-szerű szekvenciájával. Számos oka lehet ezeknek az inaktív, feltételezett profágoknak: például horizontális géntranszfer vagy olyan fágfertőzés, amely a két faj közös evolúciós szétválása során történt. Az a tény, hogy ezek a profág-szerű szekvenciák jelen vannak egyes, de nem minden vízimadár *Mycoplasma* törzsben, tovább erősíti azt a

lehetőséget, hogy ezek valóban profágok, amelyek korábban megfertőzték ezeket a törzseket.

6. Új tudományos eredménye

Ad 1. Létrehoztuk az első mag genomot célzó multilókusz tipizáló sémát *M. anserisalpingitidis* számára, valamint egy közös *M. anserisalpingitidis* – *M. anatis* cgMLST sémát is. A cgMLST séma precíz és robusztus jellege megerősíti, hogy ez az eljárás standardként alkalmazható filogenetikai tipizálásra. A filogenetikai elemzés mellett az új séma sikeresen csoportosította a törzseket azok metaadatai szerint, így növelve hasznosságát epidemiológiai megfigyelésekben.

Ad 2. Az öt atípusos törzs jellemzése jelentős eltéréseket mutatott más *M. anserisalpingitidis* törzsekhez képest, mind fenotípusos, mind

genotípusos szempontból. Az atipikus törzsek a fajhatár peremén helyezkednek el, és potenciálisan a speciáció kezdeti lépéseit képviselik.

Ad 3. Ez az első teljes genomon alapuló asszociációs vizsgálat *M. anserisalpingitidis* fajon, és mindössze a harmadik GWAS, amelyet *Mycoplasma* fajon végeztek. A tanulmány több antibiotikum-rezisztencia mechanizmust tárt fel *M. anserisalpingitidis* törzsekben, és jelentős korrelációkat mutatott ki az antimikrobiális szerek közül öt és a genomban található k-mer-ek között.

Ad 4. Vizsgálatunk során több *M. anserisalpingitidis* és *M. anatis* törzsben sikeresen azonosítottunk profág-szerű szekvenciákat, ami ezen madár *Mycoplasma* fajok esetében első alkalommal történt meg.

7. Tudományos közlemények

Lektorált folyóiratokban

Kovács, ÁB., Kreizinger, Z., Forró, B., Grózner, D., Mitter, A., Marton, S., Bali, K., Sawicka, A., Tomczyk, G., Bányai, K., Gyuranecz, M.: **The core genome multi-locus sequence typing of *Mycoplasma anserisalpingitidis*.** BMC Genomics, 21(1), 403., 2020

Kovács, ÁB., Kreizinger, Z., Forró, B., Grózner, D., Mitter, A., Marton, S., Bali, K., Sawicka, A., Tomczyk, G., Bányai, K., Gyuranecz, M.: ***Mycoplasma anserisalpingitidis* törzsek vizsgálata a maggenomot célzó multilókusz szekvenciatipizáló módszerrel.** Magyar Állatorvosok Lapja, 145, 527–534., 2023

Kovács, ÁB., Wehmann, E., Grózner, D., Bali, K., Nemeshházi, E., Hrivnák, V., Morrow, C. J., Bányai, K., Kreizinger, Z., Gyuranecz, M.: **Characterization of atypical *Mycoplasma anserisalpingitidis* strains.** Veterinary Microbiology, 280., 2023

Kovács, ÁB., Wehmann, E., Sváb, D., Bekő, K., Grózner, D., Mitter, A., Bali, K., Morrow, C. J., Bányai, K., & Gyuranecz, M.: **Novel prophage-like sequences in *Mycoplasma anserisalpingitidis*.** Infection, Genetics and Evolution, 92., 2021

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Gyuranecz Miklósnak a számos lehetőségért, támogatásért, inspirációért és segítségért az évek során. Külön köszönöm Wehmann Enikőnek, aki nemcsak meglátásaival segített, hanem szakmai útmutatásával és minden tanulmányhoz nyújtott támogatásával is.