Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

A *Pasteurella multocida* genetikai változatossága, a gazdaadaptáció jelei és az antibiotikum rezisztencia terjedése

Lipcseiné Dr. Pintér Krisztina

Témavezető: Dr. Magyar Tibor

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2026.

Témavezető:

.....
Dr. Magyar Tibor DSc
Főigazgató
HUN-REN Állatorvostudományi Kutatóintézet

Készült 8 példányban. Ez a(z) …. sz. példány.

.....
Lipcseiné dr. Pintér Krisztina

1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

A *Pasteurella multocida* egy világszerte előforduló, zoonotikus potenciállal rendelkező Gram-negatív baktériumfaj, amely jelentős gazdasági és közegészségügyi jelentőséggel bír. A faj törzsei kifejezett genotípusos és fenotípusos heterogenitást mutatnak, ami hozzájárul a különböző gazdafajokat érintő, változatos patomechanizmuson alapuló kórképek kialakulásához. A megbetegedett állatokat jellemzően antibiotikumokkal kezelik, azonban a multidrog-rezisztens (MDR) törzsek fokozott megjelenése és terjedése egyre komolyabb kihívást jelent mind az állat-, mind a humánegészségügy számára. A törzsek részletes molekuláris jellemzése, valamint antibiotikum-rezisztenciájuk mélyebb megértése kulcsfontosságú a fertőzések kórfejlődésének és járványtani dinamikájának feltárásában, a hatékony gyógykezelési stratégiák kialakításában, valamint a zoonotikus kockázatok mérséklésében. Ezek az ismeretek együttesen

elősegítik a célzott megelőzési és kezelési módszerek kidolgozását.

Kutatásunk célja a *P. multocida* törzsek részletes feno- és genotípusos jellemzése volt. Célul tűztük ki a törzsek virulenciagén-mintázata alapján meghatározott virulenciagén-profilok (VGP), az *omp*A génszekvenciák alapján felállított klaszterek, illetve a törzsek egyéb jellemzői – mint a szerotípus, a Multi-host (MH) és a Rural Industries Research and Development Corporation (RIRDC) MLST szekvenciatípus (ST), valamint a gazdafaji eredet – közötti összefüggések feltárását és statisztikai elemzését. További célunk volt hazai és francia eredetű *P. multocida* törzsek antibiotikum-érzékenységi profiljának felmérése mind fenotípusos (korongdiffúzió, leveshígításos mikromódszer), mind genotípusos (teljesgenom-szekvenálás) módszerek alkalmazásával.

2. Anyag és módszertan

Munkánk során 80, magyar és francia eredetű, különböző gazdafajokból származó *P. multocida* izolátum (2004-2023) antibiotikum-érzékenységét vizsgáltuk. Külön figyelmet fordítottunk az MDR törzsek előfordulására, valamint a rezisztenciával kapcsolatos tendenciák feltárására. A vizsgált törzseket tíz antibiotikum-osztályba tartozó antibiotikummal – penicillinek, cefalosporinok, aminoglikozidok, tetraciklinek, makrolidok, fluorokinolonok, linkózamidok, fenikolok, polimixinek és szulfonamidok – teszteltük. Az antimikrobiális rezisztenciagének szekvenciáit és az egypontos nukleotid-polimorfizmusokat a Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center, valamint a Comprehensive Antibiotic Resistance Database Resistance Gene Identifier eszközével azonosítottuk. Az MDR törzsek plazmid-hordozását a Solu szerver segítségével vizsgáltuk. A statisztikai elemzések megbízhatóságának növelése érdekében további 50, a National Center for

Biotechnology Information adatbázisban elérhető *P. multocida* genom részletes genotípusos jellemzését is elvégeztük. A vizsgálat során a törzsek szekvenciáit különböző referencia-genomokhoz illesztettük, és ezek alapján határoztuk meg a virulenciagén-hordozásukat, amely segítségével további VGP-csoportokat különítettünk el. A törzsek buroktípusát és lipopoliszacharid (LPS) genotípusát egy dán bioinformatikai szerver alkalmazásával mutattuk ki, míg a Public databases for molecular typing and microbial genome diversity adatbázis segítségével meghatároztuk a törzsek MH- és RIRDC-ST-sait.

3. Főbb eredmények és következtetések

A törzsek *omp*A génszekvenciái alapján filogenetikai fát állítottunk fel, melyben a törzsek huszonöt, jól elkülönülő klasztert alkottak. A virulenciagén-mintázatok alapján tizennégy új VGP-t azonosítottunk, így jelenleg huszonhét VGP-csoport ismert. A leggyakoribb burok-LPS genotípus kombináció az A:L3-as volt, amelyet az A:L1, és az F:L3 kombinációk követtek. Egyes törzsek több pontmutációt is hordoztak a *tad*D primerkötődési génszakaszában, amely fals negatív polimeráz láncreakciót (PCR) eredményezett. Ennek kiküszöbölésére a teljesgenom-szekvenciák alapján új primereket terveztünk, melyek lehetővé teszik a gén megbízható diagnosztikai azonosítását.

A fenotípusos antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok alapján a *P. multocida* ellen a cefalosporinok és a fenikolok bizonyultak a leghatékonyabb hatóanyagcsoportnak. Emellett megfigyeltük, hogy a törzsek többsége kifejezetten érzékeny a fluorokinolonokra és a tetraciklinekre is.

Ezzel szemben magas rezisztencia-arányt tapasztaltunk a szulfametoxazollal és a klindamicinnel szemben.

A vizsgálat átfogó genomikai és fenotípusos megközelítése új megvilágításba helyezte a *P. multocida* populációgenetikai struktúráját, gazdafaj-adaptációját és antimikrobiális-rezisztenciaprofilját.

Eredményeink és statisztikai elemzéseink több szinten is rávilágítottak arra, hogy a *P. multocida* kifejezetten magas diverzitása nem izolált genetikai tényezők eredménye, hanem komplex, egymással összefüggő virulenciagén-mintázatok, szekvencia-típusok, *omp*A-klaszterek és gazdaspecifikus adaptációs útvonalak együttes következménye.

Elemzéseink alapján a VGP-csoportok kifejezetten erős korrelációt mutattak a törzsek gazdafajával, alfajával, buroktípusával, LSP genotípusával, valamint MH-, és RIRDC-ST-jével. Ez arra utal, hogy a VGP-csoportok nem csak statisztikai klaszterek, hanem olyan genetikai mintázatokat tükröznek, amelyek hosszabb távú

evolúciós folyamatok eredményei lehetnek.

Eredményeink igazolják, hogy a *P. multocida* törzsek *omp*A-klaszterei szorosan összefüggnek a VGP-kel, ST-kel és a gazdafaji eredettel, jelezve, hogy az *omp*A variabilitása a törzsek komplex biológiai és epidemiológiai sajátosságait tükrözi.

A *tad*D gén PCR-alapú detektálása során felmerült nehézség felhívja a figyelmet a WGS-vizsgálatok fontosságára.

A törzsek antibiotikum-érzékenységi profilja alapján a pasteurellosisban szenvedő állatok kezelésére a fenikolok és a cefalosporinok továbbra is a leghatékonyabb készítmények közé tartoznak, de a törzsek többsége magas érzékenységgel rendelkezik a fluorokinolonokra, illetve a tetraciklinekre is.

Aggodalomra ad okot a fluorokinolonok esetében az egyre csökkenő érzékenységi arány. Az enrofloxacin egy kritikusan fontos antibiotikum, alkalmazása kulcsfontosságú szereppel bír a humán gyógyászatban is. A csökkenő érzékenység hátterében valószínűleg a túlzott, illetve a nem

megfelelő használat állhat.

Magas rezisztencia arányt klindamicin, illetve szulfametoxazol vizsgálata során tapasztaltunk, így ezen készítmények alkalmazása gyógykezelésre nem ajánlott, bár az utóbbi esetében a rezisztencia csak alacsony százalékban nyert genotípusos megerősítést.

A β-laktámok, illetve a makrolidok tesztelése során tapasztalt fenotípusos rezisztencia genetikai megerősítése továbbra is magyarázatra vár.

A fenotípusos vizsgálatok és a WGS-alapú ARG kimutatás eredményinek statisztikai összevetése arra utal, hogy a különböző módszerek eltérő érzékenységgel mutatják ki a rezisztenciát. A MIC-meghatározás és az ARG-profilok közötti erősebb korreláció azt jelzi, hogy a genotípusos eredmények leginkább a kvantitatív érzékenységi mérésekkel állnak összhangban. Ez alól a tetraciklinek vizsgálata képez kivételt, ahol a korongdiffúziós értékek jobban tükrözték a törzsek rezisztenciagén-hordozását.

4. Az értekezés új tudományos eredményei

1. Magyarországon elsőként végeztünk el nagyszámú (*n*=80), különböző állatfajból (*n*=12) származó *Pasteurella multocida* törzs teljesgenom-szekvenálását Illumina MiSeq platformon.

2. A törzseink, valamint az NCBI felületén elérhető egyéb izolátumok teljesgenom-szekvenciáinak feldolgozásával összesen 130 db *P. multocida* izolátum virulenciagén-mintázatának meghatározását végeztük el. Ennek során 14 új virulenciagén-profilt írtunk le, ezzel bővítve a kutatócsoportunk korábbi munkája során felállított profilokat. Ezekbe a profilokba elsőként kerültek besorolásra madár eredetű törzsek is. Munkánknak köszönhetően jelen pillanatban a *P. multocida* törzsek jellemzésére összesen 27 virulenciagén-profil áll rendelkezésünkre.

3. A *tad*D virulenciagén kimutatására új *tad*D primerpárt terveztünk, amely egy 445 bázispár méretű terméket amplifikál. Az új primerpárnak köszönhetően lehetőség adódik a korábban fals negatív eredményt adó törzsekből is kimutatni a

gént PCR alkalmazásával, ezzel elősegítve a megbízhatóbb diagnosztikai eredmények elérését.

4. A törzsek *omp*A génjének szekvenciái alapján törzsfát állítottunk fel, melyben a törzsek 25 különálló klasztert alkottak. Elsőként állapítottuk meg, hogy az egy klaszterbe kerülő törzsek tulajdonságai között összefüggések találhatók.

5. A törzsek multi-host, illetve RIRDC MLST szekvenciatípusának meghatározása során összesen 16 új (MH:6, RIRDC:10) szekvenciatípust írtunk le. A vizsgálataink alapján összefüggést tapasztaltunk a törzsek szekvenciatípusa, virulenciagén-profilja, illetve az *omp*A gén szekvenciája között.

6. Nagyszámú, különböző állatfajokból izolált, magyar, illetve francia eredetű törzsek fenotípusos és genotípusos antibiotikum-érzékenységi profilját határoztuk meg, és jellemeztük a fenotípusos módszerek hatékonyságát a genotípusos eredmények függvényében.

5. Az értekezés témájában született publikációk

5.1. Lektorált, impakt faktorral bíró tudományos folyóiratban megjelent publikációk

1. Pintér, K., Kerek, Á., Magyar, T., 2023.: **A *Pasteurella multocida* törzsek antibiotikumérzékenysége, az antimikrobiális rezisztencia genetikai háttere, Irodalmi összefoglaló**, Magyar Állatorvosok Lapja, 145 (4), 239-256., IF: 0,2

2. Pintér, K., Pollák, B. D., Gantelet, H., Magyar, T., 2024.: **Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* strains isolated from different host species**, Acta Veterinaria Hungarica, 72 (2), 71-79., IF: 0,7

3. Erdélyi, K., Pintér, K., Pollák, B. D., Bakcsa, E., Szeredi, L., Lehotzky, P., Magyar, T., 2025.: **Emergence of hemorrhagic septicemia caused by MLST type ST64 *Pasteurella multocida* in an European fallow deer population in Hungary,** Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 37 (3), 467-470., IF: 1,2

4. Pintér, K., Domán, M., Wehmann, E., Makrai, L., Gantelet, H., Magyar, T., 2025.: **Correlations between virulence gene profiles and other genetic factors of *Pasteurella multocida* strains isolated from various host species,** Veterinary Microbiology, 308 (2025), 110657., IF: 2,7

5. Pintér, K., Domán, M., Wehmann, E., Gantelet, H., Magyar T., 2025.: **Comparative analysis of phenotypic and genotypic antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida* Isolated from various host species in France and Hungary,** Antibiotics, 14 (9), 906., IF: 4,6

5.2. Konferencia poszterek, előadások

1. Pintér, K., Pollák, B. D., Makrai, L., Magyar, T.: **Különböző állatfajokból izolált *Pasteurella multocida* törzsek fenotípusos antibiotikum-érzékenységi vizsgálata**, II. Magyar Agrártudományi Doktoranduszok Szimpóziuma, Budapest, 2024. 02.16.

2. Pintér, K., Pollák, B. D., Wehmann, E., Makrai, L., Solymosi, N., Magyar, T.: ***Pasteurella***

***multocida* törzsek genotípusos jellemzése**, XXVII. Tavaszi Szél Konferencia, Budapest, 2024. május 3-5.

3. Pintér, K., Domán, M., Wehmann, E., Makrai, L., Magyar, T.: **Comparative analyses of phenotypic and genotypic antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida,*** The 7th Central European Forum for Microbiology, Siófok, Magyarország, 2025. október 6-8.

4. Pintér, K., Pollák, B. D., Makrai, L., Magyar, T.: **Különböző állatfajokból izolált *Pasteurella multocida* törzsek fenotípusos antibiotikum-érzékenységi vizsgálata**, Akadémiai Beszámolók, 2024. 01. 30.

5. Pintér, K., Pollák, B. D., Wehmann, E., Makrai, L., Solymosi, N., Magyar, T.: ***Pasteurella multocida* törzsek genotípusos jellemzése**, Akadémiai Beszámolók, 2024. 01. 30.

6. Pintér, K., Pollák, B. D., Domán, M., Wehmann, E., Makrai, L., Solymosi, N., Magyar, T.: **Virulenciagének előfordulási mintázata különböző gazdafajokból izolált *Pasteurella***

***multocida* törzsekben**, Akadémiai Beszámolók, Budapest, 2025. 01. 21.

7. Pintér, K., Domán, M., Wehmann, E., Makrai, L., Magyar T.: **A *Pasteurella multocida* genotípusos jellemzése, illetve a *Pasteurellaceae* család néhány tagjának antibiotikum-érzékenysége,** EKÖP Konferencia, Budapest, 2025. május 13.

8. Pintér, K., Domán, M., Wehmann, E., Makrai, L., Magyar T.: ***Pasteurella multocida* törzsek fenotípusos és genotípusos antibiotikum-érzékenységi profiljának összehasonlítása,** XXVIII. Tavaszi Szél Konferencia, Budapest, 2025. június 20-22.

9. Pintér, K., Domán, M., Wehmann, E., Magyar T.: ***Pasteurella multocida* törzsek fenotípusos és genotípusos jellemzői közötti összefüggések vizsgálata statisztikai elemzések segítségével,** Akadémiai Beszámolók, Budapest, 2026. 01. 27.