

**Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

***Mycoplasma bovis* izolátumok genetikai sokfélesége
és antibiotikum rezisztenciája**

PhD értekezés tézisei

Görföl-Sulyok Kinga Mária

2017

Témavezető és témabizottsági tagok:

Dr. Gyuranecz Miklós, Ph.D.
Magyar Tudományos Akadémia
Agrártudományi Kutatóközpont
Állatorvos-tudományi Intézet
témavezető

Dr. Dán Ádám, Ph.D.
Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal
Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság
témabizottság tagja

Dr. Dénes Béla, Ph.D.
Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal
Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság
témabizottság tagja

Dr. Hornok Sándor, Ph.D.
Állatorvostudományi Egyetem
Parazitológiai és Állattani Tanszék
témabizottság tagja

Bevezetés

A *Mycoplasma bovis* világszerte elterjedt kórokozó, szarvasmarhákban tüdő-, tőgy- és ízületi gyulladást idézhet elő. Európa és Észak-Amerika szarvasmarha-állományában az általa okozott gazdasági károk igen jelentősek. Magyarországon 1975-ben diagnosztizáltak először *M. bovis* okozta megbetegedést (Hale et al. 1962). A század elejére a hazai szarvasmarha állományok csaknem kétharmada (Tenk et al. 2004), 2008-ra pedig az állományok 100%-a szeropozitívnak bizonyult (Fodor et al. 2017).

A baktérium, állományon belül az állatok közvetlen érintkezésével, míg állományok között a fertőzött állatok behurcolásával terjed (Nicholas és Ayling 2003). A *M. bovis* járványtani vizsgálataihoz multi-lókus szekvencia tipizálást (multi-locus sequence typing, MLST) (Manso-Silván et al. 2012, Register et al. 2015, Becker et al. 2015, Rosales et al. 2015) és több lókuszon végzett változó számú tandem ismétlődés analízisét (multi-locus variable number of tandem repeats analysis, MLVA) fejlesztették ki (Pinho et al. 2012). Ezen módszerek ismételhetősége, valamint idő- és eszközigénye jóval kedvezőbb, mint a korábban használt módszereké.

A *M. bovis* okozta fertőzések megelőzésére jelenleg nem áll rendelkezésre hatékony vakcina, ezért a megfelelő tartási körülmények és az antibiotikum terápia a védekezés legfőbb eszközei. A *M. bovis* okozta tőgygyulladás antibiotikumos kezelése sokszor végződik eredménytelenül, viszont a kórokozó által okozott tüdőgyulladás sok esetben jól reagál az antibiotikum terápiára, ezáltal nagymértékben csökkenthetők a baktérium által okozott gazdasági károk. Csak kevés antibiotikum használható a *M. bovis* okozta fertőzések kezelésére, hiszen a Mycoplasmák eredendően rezisztensek a β -laktám antibiotikumokra, a szulfonamidokra és a polimixinekre is (Lysnyansky és Ayling 2016). A terápiában így elsősorban DNS- és fehérje szintézis gátló antibiotikumokat használnak, ezekkel szemben azonban egyre több rezisztens törzs jelent meg szerte a világon (Ayling et al. 2014, Gautier-Bouchardon et al. 2014).

A gyakorlatban a tapasztalati alapon kiválasztott, gyakran nem megfelelő terápia szer a kezelés hatástalanságához vezethet, illetve kedvez az antibiotikum rezisztencia kialakulásának is. Jelenleg az antibiotikum érzékeny és rezisztens *M. bovis* törzsek elkülönítése klasszikus mikrolevess-hígítós módszerrel lehetséges (Hannan 2000). Ez azonban igen pénz- és időigényes folyamat, ezért a diagnosztikai laboratóriumokban csak ritkán alkalmazzák. A gyors molekuláris biológiai tesztek fejlesztése lehetővé tenné a célzott antibiotikum terápia alkalmazását és az antibiotikum rezisztencia terjedésének megelőzését. Ehhez elengedhetetlen az antibiotikum rezisztencia genetikai hátterének ismerete.

A *M. bovis* elősorban pontmutációk révén, a célmolekula megváltozásával (target modification) szerez rezisztenciát. A DNS-szintézis gátló fluorokinolonok esetén a rezisztenciáért a DNS-giráz A alegységének (GyrA) vagy a topoizomeráz IV A alegységének (ParC) megváltozása felelős. A bakteriális riboszóma 30S alegységéhez kötő antibiotikumokkal (pl. tetraciklinek, spektinomycin) szembeni rezisztencia kialakulását a 16S riboszómális RNS-t kódoló gén mutációja okozza. A riboszóma 50S alegységét gátló antibiotikumok (Pl. makrolidok, linkozamidok) ellen kialakuló rezisztencia hátterében sokszor a 23S rRNS megváltozása áll.

Célkitűzések

Az értekezés célkitűzései:

- Ad 1.** a hazai *M. bovis* populáció genetikai jellemzése és járványtanának megismerése MLST és MLVA segítségével, valamint a két tipizáló módszer összehasonlítása;

- Ad 2.** a hazai *M. bovis* izolátumok *in vitro* antibiotikum érzékenységi vizsgálata mikorleves-hígításos módszerrel nyolc antibiotikum csoport tizenöt antibiotikumával szemben;

- Ad 3.** az antibiotikum rezisztens *M. bovis* izolátumok genetikai hátterének feltárása és a rezisztenciáért felelős mutációk azonosítása teljes genom szekencia meghatározás segítségével hét antibiotikum csoport (fluorokinolonok, tetraciklinek, aminociklitolok, makrolidok, linkozamidok, fenikolok, pleuromutilinek) esetén;

- Ad 4.** a *M. bovis* antibiotikum érzékenységi profiljának gyors és költséghatékony kimutatására alkalmas molekuláris biológiai tesztek fejlesztése és validálása hét antibiotikum család esetén.

Anyag és módszer

***Mycoplasma bovis* izolátumok**

Vizsgálatainkba Magyarország különböző részeiről gyűjtött tüdő, nyirokcsomó és orrtampon mintákból származó *M. bovis* izolátumokat, valamint a típustörzset (NCTC10131; PG45) vontuk be. A mintákat *Mycoplasma* táplevesben tenyésztettük (37°C, 5% CO₂), az izolátumok azonosítása pedig a *M. bovis* *uvrC* génjére specifikus PCR reakcióval történt (Subramaniam et al. 1998). Az izolátumok tisztaságát egy, a 16S/23S rRNS intergénikus szakaszra specifikus PCR reakcióval és az azt követő nukleotid sorrend meghatározással ellenőriztük (Lauerman et al. 1995). Vizsgálatainkhoz 2010 és 2013 között 35, míg 2013 és 2016 között 20 *M. bovis* izolátumot gyűjtöttünk.

Genotipizálás

A haza *M. bovis* populáció genetikai sokféleségének feltárására négy háztartási gén (*fusA*, *gyrB*, *lepA*, *rpoB*) vizsgálatán alapuló MLST módszert használtunk (Manso-Silván et al. 2012). A rokonsági viszonyok további felbontására kilenc tandem ismétlődő szakasz vizsgálatán alapuló MLVA elemzést végeztünk (Pinho et al. 2012).

A kimutatott genotípusok rokonsági viszonyait neighbour-joining filogenetikai módszerrel elemeztük. Meghatároztuk a két módszer Simpson-féle diverzitás indexét (Hunter és Gaston 1988), a két módszer közti egyezés mértékét pedig korrigált Rand és Wallace együttható segítségével vizsgáltuk (Carriço et al. 2006).

Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok

A típustörzs (PG45), valamint 35 hazai izolátum antibiotikum érzékenységi vizsgálatát végeztük el mikroleves-hígítós módszerrel (Hannan 2000) nyolc antibiotikum csoport tizenöt antibiotikumával szemben.

A legkisebb gátló koncentráció (minimum inhibitory concentration, MIC) értékeket 1 hét, 37°C-on történő inkubáció után határoztuk meg a következő antibiotikumokkal szemben: fluorokinolonok (danofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin); tetraciklinek (tetraciklin, oxitetraciklin); aminociklitol (spektinomycin); aminoglikozid (gentamicin); makrolidok (tilozin, tilmikozin, gamitromicin, tulatromicin); linkozamid (likomicin); fenikol (florfenikol) és pleuromutilinek (tiamulin, valnemulin).

Antibiotikum rezisztenciáért felelős mutációk azonosítása

A *M. bovis* izolátumok *in vitro* rezisztenciafejlődésének tanulmányozásába három, a vizsgált antibiotikummal szemben alacsony MIC értékekkel rendelkező izolátumot vontunk be, melyeket fokozatosan növekvő antibiotikum koncentrációjú táplevesben passzáltunk. A rezisztencia elérését követően, a mutáns izolátumokat ötször antibiotikum-mentes tápközegben oltottuk át, hogy teszteljük a rezisztens fenotípus stabilitását (Pereyre et al. 2004). Vizsgáltuk továbbá az izolátumok esetleges keresztrezisztenciáját is a többi vizsgált antibiotikummal szemben. A vizsgálatba 7 antibiotikumcsalád 12 antibiotikumát (danofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin, tetraciklin, oxitetraciklin, spektinomycin, tilmikozin, tilozin, linkomicin, florfenikol, tiamulin, valnemulin) vontuk be.

Elvégeztük 35 hazai *M. bovis* izolátum és 36 *in vitro* szelektált antibiotikum rezisztens törzs teljes genom szekvenálását új generációs, IonTorrent szekvenáló platform segítségével (Rónai et al. 2015), majd azonosítottuk a magas MIC értékkel összefüggő mutációkat.

Molekuláris biológiai tesztek fejlesztése a *Mycoplasma bovis* antibiotikum érzékenységének kimutatására

A fluorokinolonokkal, tetraciklinekkel, spektinomocinnal, makrolidokkal, linkomicinnal, florfenikollal és pleuromutilinekkal szembeni magas MIC értékekért felelős mutációk egyidejű kimutatására 7 nagy felbontású olvadáspont analízist (high resolution melt, HRM) és 9 pontmutációk kimutatására alkalmas ún. mismatch amplification mutation assay (MAMA) rendszert fejlesztettünk ki. A validálás első lépéseként a rendszereket ismert szekvenciájú és antibiotikum érzékenységgű hazai (n=35) és *in vitro* szelektált mutáns *M. bovis* izolátumokon (n=36) teszteltük. Vizsgáltuk a tesztek érzékenységét az egyes genotípusok tízes alapú hígítási soraival (10^6 - 10^0 kópia/ μ l). A rendszerek specifitását szarvasmarhákban előforduló más *Mycoplasma* fajok, illetve a közeli rokon faj, a *M. agalactiae* bevonásával teszteltük. Végül a rendszerek alkalmazhatóságát 30 klinikai minta bevonásával vizsgáltuk.

Eredmények

Az MLST és MLVA vizsgálatok eredményei

Harmincegy hazai *M. bovis* izolátumot vizsgálva az MLST eredményeként 6 szekvenciatípust, míg az MLVA segítségével 20 genotípust különítettünk el. A Simpson-féle diverzitás index az MLST rendszer esetében 0,776; míg az MLVA esetében 0,970. Mindkét módszerrel a magyarországi izolátumok két fő csoportra váltak szét számos elágazással és alcsoporttal, azonban a két tipizáló módszer eredményei között csekély átfedést találtunk (korrigált Rand koefficiens 0,178; korrigált Wallace koefficiens MLVA → MLST 0,099; korrigált Wallace koefficiens MLST → MLVA 0,914). Az egy állományból származó *M. bovis* törzsek genotípusai általában azonosak vagy közeli rokonságban voltak, de egy esetben ugyanazon állományon belüli eltérést is megfigyeltünk (MYC65-MYC68). Az izolátum szervi eredete (orrtampon, tüdő, nyirokcsomó) és genotípusa között nem találtunk összefüggést.

Antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok eredményei

A hazai *M. bovis* törzsek 90%-nak növekedését magas MIC értékkel gátolták a makrolidok (tilozin ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$, tilmikozin ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$, gamitromicin ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$, tulatromicin ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$), aminglikozidok (gentamicin 8 $\mu\text{g/ml}$), aminociklitolok (spektinomycin ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$), tetraciklinek (tetraciklin 16 $\mu\text{g/ml}$, oxitetraciklin ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$), linkozamidok (linkomicin ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$) és fenikolok (florfenikol 8 $\mu\text{g/ml}$). A fluorokinolonok (MIC₉₀ értékek: danofloxacin 0,312 $\mu\text{g/ml}$, enrofloxacin 0,312 $\mu\text{g/ml}$, marbofloxacin 0,625 $\mu\text{g/ml}$) és a szarvasmarhára nem törzskönyvezett pleuromutilinek (MIC₉₀ értékek: tiamulin 0,312 $\mu\text{g/ml}$, valnemulin $\leq 0,039$ $\mu\text{g/ml}$) bizonyultak *in vitro* a leghatásosabb antimikrobiális szerekeknek a hazai *M. bovis* okozta fertőzések kezelésére. Az egy állományból származó izolátumok antibiotikum érzékenységi profilja megegyezett vagy nagyon hasonló volt.

A *Mycoplasma bovis* antibiotikum rezisztenciájának genetikai háttere

Fluorokinolonokkal szemben a rezisztencia viszonylag lassú (4-10 átoltás) kialakulását figyeltük meg *in vitro* vizsgálataink során. Mind a hazai, mind az *in vitro* szelektált mutáns izolátumok (MIC ≥ 10 $\mu\text{g/ml}$) esetén a *gyrA* és *parC* gének "hot spot" régióiban (244-260 és 232-250, *Escherichia coli* szerinti nukleotid számozás) találtunk fluorokinolon rezisztenciával összefüggő, aminosav szinten is megnyilvánuló pontmutációkat. A vizsgált harmadik generációs fluorokinolonok között minden esetben keresztrezisztenciát (MIC ≥ 10 $\mu\text{g/ml}$) tapasztaltunk.

A tetraciklinek esetén igen lassú rezisztencia fejlődést figyeltünk meg (9-18 átoltás), ezzel szemben a spektinomicinnél már 2-3 átoltás elég volt a magas MIC érték (≥ 256 $\mu\text{g/ml}$)

eléréséhez. A magas tetraciklin MIC érték (MIC ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ és ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ oxitetraciklin, illetve tetraciklin esetén) háttérében a 16S rRNS-t kódoló gének (962-967, 1058 és 1195-1199 nukleotid pozíciók) mutációja állt. A spektinomycin rezisztenciát egyetlen nukleotid megváltozása okozta, mely összhangban van a gyors rezisztenciafejlődéssel. A két vizsgált tetraciklin között keresztrezisztenciát tapasztaltunk, míg a tetraciklinek és spektinomycin között csak kis mértékben (4-szeresére) emelkedett MIC értékeket kaptunk.

Két valnemulin rezisztens mutáns kivételével (10 és 14 átoltás) gyors rezisztencia fejlődést tapasztaltunk (2-6 átoltás) a vizsgált 50S gátló antibiotikumokkal szemben (tilozin, tilmikozin, linkomicin, florfenikol, tiamulin és valnemulin). A hazai izolátumok tilmikozin rezisztenciájának háttérében (MIC ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$) a 23S rRNS-t kódoló gén 748-as nukleotidjának megváltozása áll. Egy további pontmutáció (A2059G) felelős a hazai törzsek tilozinnal és linkomicinnel szembeni emelkedett MIC értékeiért (MIC ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$, illetve ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$). Az *in vitro* szelektált mutáns izolátumoknál a következő nukleotid régiókban találtunk magas MIC értékkel összefüggő pontmutációkat: 748-752, 2059-2067, 2500-2506 és 2611-2612. Gyakori keresztrezisztenciát figyeltünk meg a makrolidok és a linkomicin között, valamint egy valnemulin rezisztens mutáns minden tesztelt 50S gátlóval szemben rezisztensnek bizonyult.

A *Mycoplasma bovis* rezisztencia markereinek gyors kimutatása

A hazai *M. bovis* izolátumokban előforduló antibiotikum rezisztenciáért felelős pontmutációkra 9 MAMA (3 a fluorokinolonokra; 3 a tetraciklinekre; 1 a spektinomycinre; 2 a makrolidokra, közülük 1 a linkomicinre is), míg a rezisztenciáért felelős „hot-spot” régiókra 6 HRM rendszert (1 a fluorokinolonokra; 2 a 30S gátlókra; 4 az 50S gátlókra) terveztünk.

A rendszerek azonos hőprofilon, szimultán futtathatóak. A valós-idejű PCR rendszerek érzékenysége 10^2 - 10^5 kópia/ μl , míg az agar alapú rendszereké 10^4 - 10^5 kópia/ μl . A tesztek megbízhatóan működtek tiszta *M. bovis* tenyészetek esetén, azonban közvetlenül klinikai mintákból tisztított DNS-en eltérő hatékonyságot mutattak. A rendszerek eltérő hatékonyságát az élővilágban általánosan előforduló géneket (pl.: 16S rRNS) célzó rendszerek alacsony specifitása magyarázhatja. Ennek ellenére a nagy mennyiségű *M. bovis* DNS-t tartalmazó klinikai mintákon az általunk tervezett rendszerek egyéb kontamináns *Mycoplasma* fajok jelenlététől függetlenül megbízható eredményt adtak.

Megbeszélés

A hazai *Mycoplasma bovis* populáció genetikai változatossága

A hazai populáció genetikai állományának összetételéről eddig nem sok ismerettel rendelkezünk. Harmincegy hazai *M. bovis* izolátumot vizsgálva, mind az MLVA mind az MLST módszerrel a hazai *M. bovis* populáció nagy genetikai változékonyságát tártuk fel, azonban a két tipizáló módszer eredményei között csekély átfedést találtunk. Eredményeinkkel összhangban, a világ számos részéről a *M. bovis* törzsek nagy genetikai sokféleségét írták le, mely legalább részben az intenzív szarvasmarha kereskedelemmel magyarázható (Register et al. 2015, Rosales et al. 2015). A kivételnek számító franciaországi izolátumok csökkent változatosságának hátterében egy multirezisztens *M. bovis* klón elterjedését írták le (Becker et al. 2015). Vizsgálataink alapján, a *M. bovis* törzsek jellemzésére a két tipizáló rendszer együttes használatát javasoljuk: az MLST közepes felbontású, egymástól viszonylag távoli törzsek tipizálására, míg az MLVA nagyobb felbontású, egymáshoz közel rokon izolátumok rokonsági viszonyainak feltárására alkalmas módszer.

A hazai *Mycoplasma bovis* populáció antibiotikum érzékenységi profilja

Mivel jelenleg nem áll rendelkezésre hatékony vakcina a *M. bovis* okozta fertőzések megelőzésére, így a védekezésben fontos szerepe van a megfelelő antibiotikum terápiának. A rutin diagnosztikában az antibiotikumok *in vivo* hatékonysága *in vitro* antibiotikum érzékenységi vizsgálatokkal, a MIC értékek meghatározásával becsülhető. Az *in vitro* vizsgálatok csak jóslhatják az adott antibiotikum hatékonyságát, a gyógykezelés eredményességét egyéb tényezők is befolyásolhatják az élő szervezetben (Lysnyansky és Ayling 2016). Hazai *M. bovis* törzsek antibiotikum érzékenységének megállapítására eddig nem készült átfogó vizsgálat. Nyolc antibiotikum család 15 antibiotikumával szemben végzett *in vitro* vizsgálataink alapján a fluorokinolonok bizonyultak a legígéretesebb antimikrobiális szerekeknek a *M. bovis* okozta hazai fertőzések kezelésére. A jelenlegi Európai Unió rendelkezései azonban a fluorokinolonok alkalmazását csak súlyos, más antibiotikumra nem reagáló eseteknél ajánlják. A *M. bovis* fertőzések gyógykezelése során gyakran használt antibiotikumokkal (elsősorban a tetraciklinekkel és makrolidokkal) szemben növekvő rezisztenciát mutattunk ki. Eredményeink kiemelik a rendszeres antibiotikum érzékenységi vizsgálatok szükségességét. Korábbi *in vivo* vizsgálatokkal összhangban (Stipkovits et al. 2001, Stipkovits et al. 2005) a pleuromutilinek hatékonyan gátolták a baktérium növekedését *in vitro* vizsgálataink során, így ez az antibiotikumcsoport a későbbiekben terápiás célokra alkalmas lehet.

A *Mycoplasma bovis* antibiotikum rezisztenciájának genetikai háttere

Az antibiotikum terápiának fontos szerepe van a humán- és az állatgyógyászat területén is, de a terjedő rezisztencia következtében a kezelés sokszor végződik sikertelenül (Perron et al. 2015).

A hazai *M. bovis* izolátumok esetén magas fluorokinolon MIC értékekért (≥ 10 $\mu\text{g/ml}$) felelős pontmutációkat a DNS-giráz, illetve a topoizomeráz IV A alegységein (GyrA és ParC) találtunk. Eredményeink alátámasztják azt a korábbi megfigyelést, hogy a *gyrA* gén mutációja felelős az emelkedett fluorokinolon MIC értékért, de nagyfokú rezisztencia eléréséhez szükséges a *parC* gén megváltozása is (Lysnyansky et al. 2009, Sato et al. 2013).

Korábbi tanulmányokkal összhangban, az emelkedett tetraciklin MIC értékek hátterében az elsődleges tetraciklin kötőhely (Tet-1) megváltozása állt. A 16S rRNS-t kódoló gének ismerten rezisztenciával összefüggő pontmutációit egy kivétellel a hazai izolátumok esetében is megtaláltuk (Amram et al. 2015). A spektinomycinre ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$ MIC értékkel rendelkező valamennyi izolátum hordozta az *rrs1* gén egy pontmutációját, mely mutáció *M. bovis* spektinomycin rezisztenciájában betöltött jelentőségét korábban Schnee és mtsai (2014) is kimutatták.

A bakteriális riboszóma 50S alegységét gátló antibiotikumok esetében a 23S rRNS-t kódoló géneken találtunk magas MIC értékekkel összefüggő mutációkat, melyek közül néhány keresztrezisztenciát okozott a hasonló hatásmechanizmusú szerekkel szemben. A hazai *M. bovis* izolátumok makrolid- és linkomicin rezisztenciáért felelős mutációi megegyeztek más országokban azonosított mutációkkal, azonban a mutációk gyakorisága az egyes országok között eltérő (Lerner et al. 2014).

A *Mycoplasma bovis* rezisztencia markereinek gyors kimutatása

A fluorokinolonokkal, tetraciklinekkel, spektinomycinrel, makrolidokkal, linkomicinnel, florfenikollal és pleuromutilinokkal szembeni magas MIC értékekért felelős mutációk egyidejű kimutatására 7 HRM analízist és 9 MAMA rendszert fejlesztettünk ki. A természetben előforduló rezisztenciáért felelős mutációk nagyobb diagnosztikai jelentőséggel bírnak, mint a laboratóriumban szelektált törzsek mutációi (Sundsford et al. 2004), amit a diagnosztikai tesztek tervezése során is figyelembe vettünk. A tesztek megbízhatóan működtek tiszta *M. bovis* tenyészeteken és nagy mennyiségű *M. bovis* DNS-t tartalmazó klinikai minták esetén is, így a tüneteket okozó *M. bovis* fertőzések esetén alkalmazhatóak. A MAMA és HRM tesztek által vizsgált régiók átfednek, így növelve a módszerek megbízhatóságát, különösen klinikai mintákon alkalmazva. Az általunk fejlesztett rendszerek lehetővé teszik a különböző antibiotikum-érzékenységgel rendelkező *M. bovis* törzsek gyors és költséghatékony elkülönítését 7 antibiotikum család 12 antibiotikumával szemben, így alkalmasak lehetnek a klasszikus antibiotikum érzékenységi vizsgálatok helyettesítésére, növelve a gyógykezelés hatékonyságát.

Új tudományos eredmények

- Ad 1.** A hazai *M. bovis* izolátumok nagy genetikai változatosságát írtuk le MLST és MLVA módszerekkel. *M. bovis* törzsek jellemzésére a két módszer együttes használatát javasoljuk: először a közepes felbontású MLST, majd a törzsek további jellemzésére a nagyobb felbontású, egymáshoz közel rokon izolátumok rokonsági viszonyainak megállapítására alkalmas MLVA módszer alkalmazását ajánljuk.
- Ad 2.** Nyolc antibiotikum csoport 15 antibiotikumával végzett *in vitro* antibiotikum érzékenységi vizsgálataink alapján a fluorokinolonok bizonyultak a leghatékonyabb terápiás szernek a hazai *M. bovis* okozta fertőzések kezelésére. A terápia során gyakran használt antibiotikumok, elsősorban a tetraciklinek és makrolidok hatástalanságát írtuk le. Eredményeink hangsúlyozzák a rendszeres antibiotikum érzékenység vizsgálatok fontosságát. A pleuromutilinek hatékonyan gátolták a hazai *M. bovis* izolátumok növekedését *in vitro* vizsgálataink során, így ez az antibiotikumcsoport a későbbiekben terápiás célokra alkalmas lehet.
- Ad 3.** Elvégeztük 35 hazai *M. bovis* izolátum teljes genom szekvenálását és azonosítottuk a hazai populáció fluorokinolon, tetraciklin, spektinomycin, makrolid és linkomicin rezisztenciáért felelős mutációit. Elsőként tanulmányoztuk *M. bovis* izolátumok *in vitro* rezisztencia fejlődését tetraciklinekkel, spektinomycinrel, makrolidokkal, linkomicinnel, florfenikollal és pleuromutilinrel szemben. Azonosítottuk az *in vitro* szelektált mutánsok rezisztencia markereit. Elsőként azonosítottuk a *M. bovis* magas pleuromutilin- és florfenikol MIC értékeiért felelős mutációit a 23S rRNS-t kódoló géneken.
- Ad 4.** Kilenc MAMA és hét HRM rendszert fejlesztettünk és validáltunk a magas és alacsony fluorokinolon, tetraciklin, spektinomycin, makrolid, linkomicin, florfenikol és pleuromutilin MIC értékekkel rendelkező *M. bovis* izolátumok gyors és költséghatékony elkülönítésére. Az általunk tervezett tesztek szimultán futtathatóak. Alkalmazásuk lehetővé teszi a *M. bovis* antibiotikum érzékenységi profiljának meghatározását közvetlenül klinikai mintákon 1 nap alatt, *M. bovis* izolátumokon pedig 3-4 nap alatt 7 antibiotikum csoport 12 antibiotikumával szemben. A megbízhatóbb antibiotikum érzékenység meghatározáshoz, különösen klinikai minták esetén, a MAMA és HRM rendszerek együttes használatát javasoljuk.

Publikációs lista

A kutatás témájával kapcsolatban, lektorált tudományos folyóiratokban megjelent közlemények

Sulyok, K.M., Bekő, K., Kreizinger, Z., Wehmann, E., Jerzsele, Á., Rónai, Z., Turcsányi, I., Makrai, L., Szeredi, L., Jánosi, S., Nagy, S.Á., Gyuranecz, M.: **Development of molecular methods for the rapid detection of antibiotic susceptibility of *Mycoplasma bovis***, Vet. Microbiol., [submitted].

Sulyok, K.M., Kreizinger, Z., Wehmann, E., Lysnyansky, I., Bányai, K., Marton, S., Jerzsele, Á., Rónai, Z., Turcsányi, I., Makrai, L., Jánosi, S., Nagy, S.Á., Gyuranecz, M.: **Mutations associated with decreased susceptibility to seven antimicrobial families in field and laboratory-derived *Mycoplasma bovis* strains**, Antimicrob. Agents Chemother., 61. e01983-16, 2017.

Sulyok, K.M., Kreizinger, Z., Fekete, L., Hrivnák, V., Magyar, T., Jánosi, S., Schweitzer, N., Turcsányi, I., Makrai, L., Erdélyi, K., Gyuranecz, M.: **Hazai *Mycoplasma bovis* törzsek antibiotikum-érzékenységének vizsgálata** (bővített másodközlés), Magy. Állatorvosok, 139. 169-179, 2017.

Sulyok, K.M., Kreizinger, Z., Fekete, L., Hrivnák, V., Magyar, T., Jánosi, S., Schweitzer, N., Turcsányi, I., Makrai, L., Erdélyi, K., Gyuranecz, M.: **Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma bovis* strains isolated from cattle in Hungary, Central Europe**, BMC Vet. Res., 10. 256, 2014.

Sulyok, K.M., Kreizinger, Z., Fekete, L., Jánosi, S., Schweitzer, N., Turcsányi, I., Makrai, L., Erdélyi, K., Gyuranecz, M.: **Phylogeny of *Mycoplasma bovis* isolates from Hungary based on multi locus sequence typing and multiple-locus variable-number tandem repeat analysis**, BMC Vet. Res., 10. 108, 2014.

Egyéb, lektorált folyóiratokban megjelent tudományos közlemények

- Sulyok, K.M.*, Gyuranecz, M.*, Balla, E., Mag, T., Balázs, A., Simor, Z., Dénes, B., Hornok, S., Bajnóczi, P., Hornstra, H.M., Pearson, T., Keim, P., Dán, Á.: **Q fever epidemic in Hungary, April to July 2013**, Euro Surveill., 19. 20863, 2014. *These authors contributed equally to this article
- Sulyok, K.M., Kreizinger, Z., Hornstra, H.M., Pearson, T., Szigeti, A., Dán, Á., Balla, E., Keim, P.S., Gyuranecz, M.: **Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants and human in Hungary: indication of various genotypes**, BMC Vet. Res., 10. 107, 2014.
- Sulyok, K.M., Hornok, S., Abichu, G., Erdélyi, K., Gyuranecz, M.: **Identification of novel *Coxiella burnetii* genotypes from Ethiopian ticks**, Plos ONE 9. e113213, 2014.
- Flaisz, B., Sulyok, K.M., Kováts, D., Kontschán, J., Csörgő, T., Csapak, Á., Gyuranecz, M., Hornok, S.: **Babesia genotypes in *Haemaphysalis concinna* collected from birds in Hungary reflect phylogeographic connections with Siberia and the Far East**, Ticks Tick Borne Dis. [in press].
- Hornok, S., Mulvihill, M., Szőke, K., Gönczi, E., Sulyok, K.M., Gyuranecz, M., Hofman-Lehman, R.: **Impact of a freeway on the dispersal of ticks and *Ixodes ricinus*-borne pathogens: forested resting areas may become Lyme disease hotspots**, Acta Vet. Hung., 65. 242-252, 2017.
- Kreizinger, Z., Sulyok, K.M., Bekő, K., Szabó, Z., Gyuranecz, M.: **Development of mismatch amplification mutation assays for the differentiation of MS1 vaccine strain from wild-type *Mycoplasma synoviae* and MS-H vaccine strains**, Plos ONE, 12. e0175969, 2017.
- Kreizinger, Z., Erdélyi, K., Felde, O., Fabbi, M., Sulyok, K.M., Magyar, T., Gyuranecz, M.: **Comparison of virulence of *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* genotypes B.12 and B.FTNF002-00**, BMC Vet. Res., 13. 46, 2017.
- Gróznér, D., Kreizinger, Z., Sulyok, K.M., Rónai, Z., Hrivnák, V., Turcsányi, I., Jánosi, S., Gyuranecz, M.: **Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma* sp. 1220 strains isolated from geese in Hungary**, BMC Vet. Res., 12. 170, 2016.
- Kreizinger, Z., Sulyok, K.M., Makrai, L., Rónai, Z., Fodor, L., Jánosi, S., Gyuranecz, M., **Antimicrobial susceptibility of *Bacillus anthracis* strains from Hungary**, Acta Vet. Hung., 64. 141-147, 2016.

- Kreizinger, Z., Szeredi, L., Bacsadi, Á., Nemes, C., Sugár, L., Varga, T., Sulyok, K.M., Szigeti, A., Ács, K., Tóbiás, E., Borel, N., Gyuranecz, M.: **Occurrence and significance of *Coxiella burnetii* and Chlamydiales in abortions of domestic ruminants and in wild ruminants in Hungary, Central Europe**, J. Vet. Diagn. Invest., 27. 206-210, 2015.
- Kreizinger, Z., Sulyok, K.M., Pásztor, A., Erdélyi, K., Felde, O., Povaszán, J., Kőrösi, L., Gyuranecz, M.: **Rapid, simple and cost-effective molecular method to differentiate the temperature sensitive (ts+) MS-H vaccine strain and wild-type *Mycoplasma synoviae* isolates**, Plos ONE, 10. e0133554, 2015.
- Kreizinger, Z., Foster, J.T., Rónai, Z., Sulyok, K.M., Wehmann, E., Jánosi, S., Gyuranecz, M.: **Genetic relatedness of *Brucella suis* biovar 2 isolates from hares, wild boars and domestic pigs**, Vet. Microbiol., 172. 492, 2014.
- Hornok, S., Abichu, G., Meli, M.L., Tánczos, B., Sulyok, K.M., Gyuranecz, M., Gönczi, E., Farkas, R., Hofmann-Lehmann, R.: **Influence of the biotope on the tick infestation of cattle and on the tick-borne pathogen repertoire of cattle ticks in Ethiopia**, Plos ONE, 9. e106452, 2014.

Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném megköszönni témavezetőmnek, Gyuranecz Miklósnak az elmúlt évek során nyújtott támogatást és inspirációt és pozitív hozzáállást.

Köszönöm Dán Ádámnak, Dénes Bélának és Hornok Sándornak hogy megosztották velem szakmai tapasztalataikat és segítettek munkámat.

Köszönet illeti Wehmann Enikőt a támogatásért és segítőkészségért.

Köszönöm mindenkinek, aki segítségemre volt a mintagyűjtésben, így Makrai Lászlónak, Jánosi Szilárdnak, Rónai Zsuzsannának, Szeredi Leventének, Turcsányi Ibolyának és Nemes Csabának.

Hálás vagyok Marton Szilviának és Bányai Krisztiánnak a teljes genom szekvenálásban nyújtott segítségükért. Köszönet illeti Inna Lysnyankyt a vizsgálataimban nyújtott közreműködésért.

Külön köszönetet érdemel Kreizinger Zsuzsa, Hrivnák Veronika, Stammné Felde Orsolya, Gróznér Dénes és Bekő Katinka a vég nélküli türelmükért és segítőkészségükért.

Szeretném megköszönni a családomnak és barátaimnak bátorításukat és támogatásukat. Végül, de nem utolsó sorban pedig Görföl Tamásnak szeretném megköszönni a munkában, illetve a hétköznapokban nyújtott segítségét és szeretetét, ami nélkül ez a munka nem készülhetett volna el.

A vizsgálatokhoz az anyagi forrást a Magyar Tudományos Akadémia Lendület (Momentum) programja (LP2012-22) biztosította.