

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

***MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* ÉS
M. SYNOVIAE GENETIKAI VIZSGÁLATA
ÉS DIAGNOSZTIKAI CÉLÚ
MOLEKULÁRIS TESZTEK FEJLESZTÉSE**

dr. Bekő Katinka

Témavezető: Dr. Gyuranecz Miklós



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2021

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....
Dr. Gyuranecz Miklós, Ph.D. Habil.
Állatorvos-tudományi Intézet
Agrártudományi Kutatóközpont
Témavezető

Dr. Kreizinger Zsuzsa, Ph.D.
Állatorvos-tudományi Intézet
Agrártudományi Kutatóközpont
Témabizottsági tag

Dr. Bányai Krisztián, Ph.D.
Állatorvos-tudományi Intézet
Agrártudományi Kutatóközpont
Témabizottsági tag

.....
dr. Bekő Katinka

Bevezetés

A *Mycoplasma gallisepticum* és *M. synoviae* csirkében és pulykában világszerte előforduló fakultatív patogének. A *M. gallisepticum* fertőzés leggyakrabban légzőszervi tünetek formájában jelentkezik, míg a *M. synoviae* általában a savóshártyák gyulladását okozza és tojáshéj-rendellenességek kialakulásával is összefüggésbe hozható (Ley és Yoder, 1997; Feberwee és mtsai, 2009). Magyarországon Bamberger és Csontos adott hírt elsőként *M. gallisepticum*-hoz kapcsolódó légzőszervi megbetegedésről 1953-ban, míg a fertőző synovitis 1958-ban jelent meg először hazánkban (Bamberger és Csontos, 1953; Derzsi és Tóth Baranyi, 1960). Ezt követően, az intenzív baromfitartás elterjedésével a *M. gallisepticum* és *M. synoviae* fertőzés egyre gyakoribbá vált, napjainkban pedig a mycoplasmák közül világszerte e két faj okozza a legnagyobb gazdasági károkat a csirke- és pulykaállományokban. A védekezés leghatékonyabb módja a mentesítés, melyet azonban számos tényező nehezít. A vakcinázás hosszútávon nyújthat megoldást, míg az antibiotikum terápia rövidtávon hozhat enyhülést

(Ley és Yoder, 1997; Levisohn és Kleven, 2000; Kleven, 2008).

Filogenetikai vizsgálatokhoz és járványtani nyomozásokhoz elengedhetetlen a *M. gallisepticum* törzsek közötti genetikai kapcsolatok feltárása. A legmegbízhatóbb genotipizáló módszer a multi-locus sequence typing (MLST), mely a törzseket bizonyos háztartási gének nukleotid sorrendje alapján szekvenciátípusokba sorolja (Ghanem és El-Gazzar, 2019).

Mivel a világ számos országában alkalmaznak élő vakcinákat a védekezéshez, a *M. gallisepticum* vakcinatörzsek vad, virulens izolátumoktól való elkülönítése nélkülözhetetlen. A mismatch amplification mutation assay (MAMA), mely pontmutációk kimutatására alkalmas PCR-alapú technika, megfelelő módszer erre a célra (Birdsell és mtsai, 2012).

Az utóbbi időben egyre több tanulmány számol be a makrolidok és a linkomicin *M. synoviae* izolátumokkal szemben tapasztalt magas minimális gátló koncentráció (MIC) értékeiről. A fluorokinolon-érzékenység ugyancsak csökkent az elmúlt néhány évtizedben, mely különösen aggasztó, hiszen ezek használata kulcsfontosságú a humán orvoslásban (Kreizinger és mtsai, 2017; Catania

és mtsai, 2019). Az antibiotikumok körültekintő alkalmazását segíti az antibiotikum-érzékenység előzetes meghatározása. Ezért egyre növekvő igény mutatkozik gyors antibiotikum-érzékenységi tesztek iránt, mint például rezisztencia-kapcsolt mutációk kimutatása molekuláris biológiai módszerek segítségével (Sulyok és mtsai, 2018). Különböző baktériumokban, köztük mycoplasmákban is számos rezisztencia-kapcsolt mutáció került már leírásra, fluorokinolonok esetén a DNS-giráz és topoizomeráz IV kódoló génekben (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*), aminoglikozidok és tetraciklinek esetén a 16S rRNS kódoló génekben (*rrsA*, *rrsB*), makrolidok, linkozamidok, pleuromutilinek és fenikolok esetén pedig a 23S rRNS és riboszómális protein L3, L4 és L22 kódoló génekben (*rrlA*, *rrlB*, *rplC*, *rplD*, *rplV*) (Le Carrou és mtsai, 2006; Lysnyansky és mtsai, 2013; 2015; Sulyok és mtsai, 2017).

Célkitűzések

Célul tűztük ki:

1. egy *M. gallisepticum* törzsek genotipizálására alkalmas MLST rendszer fejlesztését.

2. *M. gallisepticum* törzsek genetikai kapcsolatainak feltárását a tervezett MLST rendszer segítségével a módszer elkülönítőképességének vizsgálata és a kórokozó járványtanának jobb megismerése céljából.

3. *M. gallisepticum* vakcinatörzsek és vad izolátumok elkülönítésére alkalmas gyors molekuláris biológiai tesztek (MAMA rendszerek) fejlesztését.

4. a tervezett MLST és MAMA rendszerek eredményeinek összehasonlítását a módszerek megbízhatóságának értékelése céljából.

5. csökkent antibiotikum érzékenység genetikai hátterének tanulmányozását, és molekuláris tesztek fejlesztésére alkalmas, feltehetően rezisztencia kapcsolt mutációk azonosítását *M. synoviae* törzsekben 8 antibiotikum család 14 antibiotikumának vizsgálatával.

Anyag és módszer

***Mycoplasma gallisepticum* minták**

A tesztek fejlesztése során 19 *M. gallisepticum* teljes genom szekvenciát (WGS) vizsgáltunk *in silico*. Ezenkívül a *M. gallisepticum* ATCC 19610 típusörzset, az élő 6/85, ts-11, F és K vakcinatörzseket, valamint 266, szintenyészeteket és klinikai mintákat egyaránt tartalmazó DNS mintát használtunk fel. A minták *M. gallisepticum*-pozitivitását hagyományos (Garcia és mtsai, 2005) vagy real-time Taqman (Raviv és Kleven, 2009) PCR segítségével ellenőriztük. Egyéb, kontamináns mycoplasmák jelenlétét univerzális *Mycoplasma* PCR segítségével vizsgáltuk (Lauerman és mtsai, 1995), a termékeket Sanger szekvenálásnak vetettük alá, a szekvenciákat pedig BLAST segítségével ellenőriztük.

***M. gallisepticum* törzsek genotipizálására alkalmas MLST rendszer fejlesztése**

A 19 *M. gallisepticum* WGS segítségével számos háztartási gént vizsgáltunk, melyek közül 15-öt választottunk ki primertervezésre. A primereket tíz diverz

M. gallisepticum mintán teszteltük, a PCR termékeket Sanger szekvenálásnak vetettük alá. Valamennyi egyedi allélvariánshoz egy-egy allélszámot rendeltünk, az egyes locusok elkülönítőképességet pedig a Simpson-féle diverzitás index (SI) segítségével értékeltük (Hunter és Gaston, 1988). Az MLST rendszerhez a legnagyobb variabilitást mutató locusokat választottuk ki. Összesen 131 *M. gallisepticum* mintát vizsgáltunk a tervezett MLST rendszer segítségével. A törzseket az egyes locusokhoz tartozó allélszámok alapján szekvenciatípusokba (ST) soroltuk. A locusok és a módszer elkülönítőképességét a Simpson-féle diverzitás index (SI) segítségével értékeltük (Hunter és Gaston, 1988). A konkatenált szekvenciák molekuláris filogenetikai analízisét Maximum Likelihood módszerrel végeztük (Hasegawa és mtsai, 1985). A *M. imitans* külcsoport (ATCC 51306 típus törzs) bevonásával készült filogenetikai törzsfát Neighbor-Joining módszerrel készítettük (Nei és Saitou, 1987; Tamura, 1992). A tesztek specificitását 14 különböző madár *Mycoplasma* faj bevonásával vizsgáltuk. Az érzékenység meghatározásához az ATCC 19610 típus törzs DNS-éből tízszeres hígítási sort készítettünk, melyet 10^5 - 10^0 templát kópiaszám/μl koncentráció-tartományban vizsgáltunk.

***M. gallisepticum* vakcinatörzsek és vad izolátumok elkülönítésére alkalmas MAMA tesztek fejlesztése**

A vakcinatörzsek újgenerációs szekvenálását Ion Torrent vagy Illumina NextSeq 500 platformon végeztük. A vakcina-specifikus pontmutációk (SNP) azonosítását követően azokra MAMA rendszereket terveztünk. A legjobb elkülönítőképességű rendszereket 250-281 *M. gallisepticum* DNS mintán teszteltük. A ts-11-specifikus SNP-ket tartalmazó, illetve Ausztráliából származó izolátumokat egy Ricketts és mtsai (2017) által tervezett PCR segítségével is vizsgáltuk. A stabilitási tesztek során valamennyi genotípust 10-szer passzáltunk, mely kb. 33,22 generációváltást eredményezett (Choi és mtsai, 2017). A tervezett MAMA-k specificitását 14 különböző madár *Mycoplasma* faj bevonásával vizsgáltuk. Az érzékenység meghatározásához valamennyi genotípus DNS-éből tízszeres hígítási sort készítettünk, melyet 10^6 - 10^0 templát kópiaszám/μl koncentráció-tartományban teszteltünk. A két genotípust különböző templát kópiaszámban tartalmazó, kevert mintákat is vizsgáltunk. Az egyes tesztek eredményeinek összehasonlítása során kiszámoltuk a (korrigált) Rand együtthatókat (Pinto és mtsai, 2007).

Feltehetően rezisztencia-kapcsolt mutációk azonosítása csökkent antibiotikum-érzékenységet mutató *M. synoviae* törzsekben

Összesen 96 *M. synoviae* törzset, köztük az NCTC 10124 típus-törzset, az MS-H és MS1 vakcinatörzseket, valamint 93 izolátumot vizsgáltunk. A *M. synoviae*-pozitivitást hagyományos (Wang és mtsai, 1997) vagy real-time Taqman (Raviv és Kleven, 2009) PCR segítségével ellenőriztük. Egyéb, kontamináns mycoplasmák jelenlétét univerzális *Mycoplasma* PCR segítségével vizsgáltuk (Lauerman és mtsai, 1995), a termékeket Sanger szekvenálásnak vetettük alá, a szekvenciákat pedig BLAST segítségével ellenőriztük. A MIC értékeket leves mikrohígítási módszer segítségével határoztuk meg (Hannan, 2000) a következő antibiotikumokra: enrofloxacin, difloxacin, doxiciklin, oxitetraciklin, klórtetraciklin, spektinomycin, neomicin, tilozin, tilmikozin, tilvalozin, linkomicin, florfenikol, tiamulin, valnemulin. A *M. synoviae* törzsek újgenerációs szekvenálását Ion Torrent vagy Illumina NextSeq 500 platformon végeztük. Megvizsgáltuk a rezisztenciáért felelős géneket, és azonosítottuk azokat a mutációkat, melyek nagy számú magas MIC értéket mutató törzsekben fordultak elő, vagy *Mycoplasma* fajokban antibiotikum-rezisztenciával

összefüggésben korábban már leírásra kerültek. A törzseket MLST-vel (El-Gazzar és mtsai, 2017), Maximum Likelihood módszer segítségével (Hasegawa és mtsai, 1985) genotipizáltuk. Az *rrlA/rrlB* génekben a 2054-es nukleotid meghatározására egy hagyományos PCR-ből és egy azt követő MAMA tesztből álló rendszert fejlesztettünk. Különböző *tet* gének jelenlétének vizsgálata érdekében a magas tetraciklin MIC értékeket mutató törzsek draft genomjait *in silico* analízisnek vetettük alá (Bankevich és mtsai, 2012), a *tet(M)*-pozitivitást pedig hagyományos PCR segítségével is vizsgáltuk (Shahid és mtsai, 2014b).

Eredmények

***M. gallisepticum* törzsek genotipizálására alkalmas MLST rendszer fejlesztése**

A tesztelt 15 háztartási gén közül 6 locust (*atpG*, *dnaA*, *fusA*, *rpoB*, *ruvB*, *uvrA*) választottunk ki az MLST rendszerhez. Az *atpG* és *dnaA* gének esetén keresztreakciókat tapasztaltunk más madár *Mycoplasma* fajokkal, a szekvencia-analízis alapján azonban ezek a fajok egyértelműen elkülöníthetők voltak a *M. gallisepticum*-tól. A tesztek érzékenysége valamennyi locus esetén 10^3 templát kópiaszám/ μ l volt. A 131 *M. gallisepticum* izolátum vizsgálata locusonként 17-21 allélvariánst, összesen 57 egyedi ST-t, és 0,958-as Simpson-féle diverzitás indexet eredményezett. A legtöbb SNP-t a *dnaA* tartalmazta (36/415), míg a legnagyobb variabilitást az *rpoB* mutatta (0,913). Az ST9-11-be tartozó minták házi pirok eredetű törzsek voltak (1994-2008), az ST29 fogoly, fácán és csirke eredetű izolátumokat tartalmazott (2012-2017), míg az ST21-22-be tartozó minták a Közel-Keletről származtak (2006-2016). Az ST38-ba olyan hazai pulykatelepekről izolált minták kerültek, melyek azonos integrációhoz tartoztak. A

6/85 vakcinatörzs az ST14-be került 14 másik mintával együtt. Közeli rokonai az ST13-ba és ST16-ba tartoztak. A ts-11 vakcinatörzs 12 másik mintával együtt az ST49-be került, melyhez legközelebb az ST48, ST50 és ST45 állt. Az F vakcinatörzssel annak szekvenciatípusában (ST5) egyetlen minta osztozott, míg a K vakcinatörzs az ST57 egyetlen képviselője volt. A *M. imitans* ATCC 51306 típusörzs konkatenált szekvenciája a *M. gallisepticum* ATCC 19610 típusörzssel összevetve 380/2636 SNP-t és egy 3 bp hosszúságú deléciót mutatott.

***M. gallisepticum* vakcinatörzsek és vad izolátumok elkülönítésére alkalmas MAMA tesztek fejlesztése**

Az előzetes eredmények alapján két 6/85, három ts-11, két F, és egy K vakcinatörzsre tervezett MAMA-t választottunk ki az elkülönítő rendszerekhez. A tesztek virulencia génekben (*crmA*, *gapA*, *hlp2*, *lpd*, *plpA*, *glpK*), egy ABC transzporter fehérje kódoló génben (*potC*), valamint egy foszfortranszferáz rendszerhez tartozó fruktóz-specifikus enzim kódoló génben (*fruA*) talált mutációkat céloztak. A tesztek egyértelműen elkülönítették a két genotípust mind termékméret, mind olvadáspont alapján. A negatív kontrollok és más madár *Mycoplasma* fajok templátjai nem, vagy a két genotípustól

eltérő tartományban amplifikálódtak. A tesztek érzékenysége melt-MAMA esetén 10^2 - 10^4 , agaróz-MAMA esetén 10^3 - 10^5 kópia/ μ l között változott, kevert minták esetén (10^6 : 10^6 , 10^6 : 10^5 , 10^5 : 10^6 templát kópiaszám/ μ l) pedig mindkét genotípus kimutatható volt. A stabilitási vizsgálatokban, a sorozatos passzálás során a törzsek genotípusa nem változott. Az egyes MAMA tesztek között magas Rand együtthatókat kaptunk (0,920-1,000).

A tervezett *M. gallisepticum* MLST és MAMA rendszerek eredményeinek összehasonlítása

A MAMA tesztek és az MLST rendszer között magas Rand együtthatókat kaptunk (0,826-1,000). Inkongruens eredményeket elsősorban olyan izolátumok esetén tapasztaltunk, melyek közeli rokonságban álltak a 6/85 vagy ts-11 vakcinatörzsekkel. Ezek MAMA tesztekkel a vakcinatörzsek genotípusát mutatták (1-2/2636 SNP MLST-vel), vagy bizonytalan eredményeket adtak (7-10/2636 SNP MLST-vel). A Ricketts és mtsai (2017) által tervezett PCR alacsony Rand együtthatókat mutatott a MAMA tesztekkel (0,495-0,605) és az MLST-vel (0,486-0,505) egyaránt, ugyanis öt ausztrál vad-típusú minta hordozta, míg öt vakcina-típusú minta nélkülözötte a ts-11-specifikus szekvenciákat.

Feltehetően rezisztencia-kapcsolt mutációk azonosítása csökkent antibiotikum-érzékenységet mutató *M. synoviae* törzsekben

A *M. synoviae* törzsekkel szemben mutatott magas doxiciklin, tiamulin és valnemulin, illetve alacsony neomicin MIC értékek hiánya miatt ezeket az antibiotikumokat nem vizsgáltuk tovább. A *gyrA* génben a G28A, A428G, A566G, T1360A, C1361A és G1651A; a *gyrB* génben a C446T, C1247A és G1250A; a *parC* génben az A253G, C254T, T256C, G265C/T, G1354A, G1798A és C2442A; míg a *parE* génben a C260T bizonyult feltehetően rezisztencia-kapcsolt SNP-nek. A magas fluorokinolon MIC értékeket (>1,25 µg/ml) mutató *M. synoviae* törzsek 88,73 %-a hordozott a felsoroltak közül legalább egy mutációt. A hot spot régió (253-265 nukleotidok) mutációi kiemelkedő jelentőségűnek bizonyultak (85,92 %). Az *rrlA/rrlB* génekben talált A2054G és A2055G feltehetően makrolid és linkomicin rezisztencia-kapcsolt SNP-nek bizonyult. Az A2054G mutációt összesen 14 törzs hordozta mindkét *rrl* génben, míg hat törzs heterozigóta volt erre a pozícióra nézve. A kérdéses nukleotid meghatározására tervezett PCR kimutatta, hogy ezek közül öt törzs az *rrlA*, egy törzs pedig az *rrlB* génben hordozta ezt a mutációt. Az *rpIV* génben

azonosított A276C/T ugyancsak feltehetően makrolid rezisztencia-kapcsolt mutációnak bizonyult. Valamennyi *M. synoviae* törzs, mely emelkedett MIC értékeket mutatott ezekre az 50S gátlókra (>8 µg/ml tilmikozinra; >1 µg/ml tilozinra; >0,5 µg/ml tilvalozinra; >2 µg/ml linkomicinre) pontosan egy mutációt hordozott a felsoroltak közül. Nem tudtunk azonban csökkent tetraciklin (MIC >4 µg/ml), spektinomycin vagy florfenikol (MIC >2 µg/ml) érzékenységgel összefüggésbe hozható mutációkat azonosítani, és *tet* géneket sem találtunk. Az MLST (El-Gazzar és mtsai, 2017) a 96 vizsgált *M. synoviae* törzs nagy genetikai diverzitását tárta fel, ezek ugyanis összesen 42 ST-t eredményeztek. A neighbor-joining fa igazolta, hogy a törzsek antibiotikum-érzékenységi profilja különbözhet azonos ST-n belül, vagy akár azonos származási hely esetén is.

Megbeszélés

***M. gallisepticum* törzsek genotipizálására alkalmas MLST rendszer fejlesztése**

A nagyszámú ST és magas SI a rendszer jó elkülönítőképességét jelzi. Ugyanakkor az MLST képes volt azonosítani egymással közeli rokonságban álló törzseket is, melyek különböző telepekről származtak, ám járványtani kapcsolatban álltak egymással (ST38). Bizonyos ST-okat egymástól távol eső országokból is sikerült izolálni, mely az intenzív nemzetközi kereskedelem jelentőségére utal. Egyes ST-ok pedig hosszú idő, akár 5-12 év elteltével is izolálásra kerültek (ST9-11, ST21-22, ST29), és képesek voltak megfertőzni vad- és házimadár fajokat egyaránt (ST29). A fertőzés elleni védekezés hiányában a virulens törzsek feltehetően hosszabb ideig fennmaradhatnak vadon élő vagy extenzíven tartott madarakban, melyek azután a kórokozót házi baromfinak is átadhatják. Az MLST segítségével feltárható a vakcinatörzsek és izolátumok közötti genetikai távolság is. A tervezett MLST tehát filogenetikai és járványtani vizsgálatokhoz, valamint vad és vakcinatörzsek elkülönítésére egyaránt használható.

***M. gallisepticum* vakcinatörzsek és vad izolátumok elkülönítésére alkalmas MAMA tesztek fejlesztése**

A tervezett tesztek virulencia faktorokkal összefüggésbe hozható génekben talált mutációkat céloztak, melyek a sorozatos passzálások során stabilnak bizonyultak. Az *in vitro* eredmények azonban nem feltétlenül tükrözik megbízhatóan az *in vivo* stabilitást. A tanulmány során limitáló tényező volt egyes vakcinatörzs reisolátumok alacsony száma (F) vagy hiánya (K). Mindazonáltal, a MAMA tesztek eredményei megfeleltek a vizsgált állatra, állományra vagy származási országra vonatkozó ismert vakcinázási előzményeknek. A tervezett MAMA tesztek használatával az F, 6/85, ts-11 és K vakcinatörzsek izolálás nélkül, egyszerűen, gyorsan és költséghatékony módon különíthetők el a vad izolátumoktól, sőt, segítségével akár mindkét genotípus kimutatható a kevert mintákból.

A tervezett *M. gallisepticum* MLST és MAMA rendszerek eredményeinek összehasonlítása

A MAMA tesztek és az MLST között tapasztalt magas Rand együtthatók bizonyítják a tesztek megbízhatóságát. Mindazonáltal az MLST képes volt elkülöníteni a ts-11 és 6/85 vakcinatörzsektől azokkal közeli rokonságban álló

izolátumokat is, melyek MAMA tesztekkel a vakcinatörzsek genotípusát mutatták, vagy bizonytalan eredményeket adtak. A legmegbízhatóbb tesztnek a MAMA-6/85-gapA és a MAMA-ts11-plpA bizonyultak. Az eredmények megbízhatósága érdekében azonban valamennyi MAMA teszt elvégzése, kétes esetben pedig MLST vizsgálat javasolt. A MAMA tesztek és MLST vizsgálat által kapott eredmények jelentős eltérést mutattak a Ricketts és mtsai (2017) által tervezett PCR eredményeihez képest. A fals pozitív minták többsége a ts-11 vakcinatörzshöz hasonlóan Ausztráliából származott. A negatív eredmények értékelése nehéz, hiszen a DNS minták minősége, és az egyes tesztek érzékenysége is befolyásolhatta ezeket.

Feltehetően rezisztencia-kapcsolt mutációk azonosítása csökkent antibiotikum-érzékenységet mutató *M. synoviae* törzsekben

Számos fluorokinolon-rezisztencia markert azonosítottunk a vizsgált *M. synoviae* törzsekben. A *parC* gén ismerten rezisztenciához köthető hot spot régiója (Le Carrou és mtsai, 2006; Lysnyansky és mtsai, 2013) kiemelt jelentőségűnek bizonyult, hiszen a magas MIC értéket mutató törzsek többsége hordozott valamilyen

mutációt ebben a régióban. A C254T az enrofloxacin és a difloxacin MIC értékét is emelte, míg az A253G, mely ugyanazon aminosav pozíciót érintette, csak a difloxacin MIC értékére volt hatással. A *gyrA* génben talált A428G ugyancsak ismert rezisztencia-kapcsolt mutáció (Le Carrou és mtsai, 2006; Lysnyansky és mtsai, 2013). A *gyrB* génben azonosított C1247A és G1250A korábban már leírásra került Lysnyansky és mtsai (2013) által, csökkent fluorokinolon-érzékenységgel azonban az említett tanulmányban nem hozták összefüggésbe. Ezenkívül valamennyi génben azonosítottunk új, korábban még leírásra nem került, feltehetően rezisztencia-kapcsolt pontmutációkat. Ezek zömmel a *parC* hot spot régiójában található mutációkkal együttesen fordultak elő, jelentőségük megítélése ezért nem egyszerű. Két magas MIC értéket mutató törzsben azonban a *gyrA*, *gyrB* és *parE* génekben újonnan leírt pontmutációk a hot spot eltérései nélkül is előfordultak, ezért azt gondoljuk, ezeknek is lehet szerepe a csökkent fluorokinolon-érzékenységben. Az *rrl* génekben talált A2054G és A2055G ismert makrolid és linkomicin rezisztencia-kapcsolt pontmutációk (Lysnyansky és mtsai, 2015). Az A2054G jelenléte az egyik *rrl* génben (*rrlA* vagy *rrlB*) elegendő volt a MIC értékek

emelkedéséhez. Az *rpIV* génben talált non-szinonim mutáció (A276C/T) ugyancsak hatással volt a tilmikozin érzékenységre. Ez a mutáció korábban már leírásra került Lysnyansky és mtsai (2015) által, makrolid-rezisztenciával azonban az említett tanulmányban nem hozták összefüggésbe. A tetraciklin, spektinomycin és florfenikol érzékenységgel kapcsolatba hozható mutációk és *tet* gének hiánya eltérő rezisztencia mechanizmusokat feltételez. Eredményeink hozzájárulnak a *M. synoviae* törzseknél tapasztalt antibiotikum-rezisztencia genetikai hátterének megismeréséhez, a rezisztencia-kapcsolt mutációk azonosítása pedig lehetőséget teremt az antibiotikum-érzékenység molekuláris biológiai módszerekkel történő gyors meghatározására (Sulyok és mtsai, 2018).

Új tudományos eredmények

Ad 1. *M. gallisepticum* törzsek genotipizálására alkalmas MLST rendszert terveztünk, mely nagy elkülönítőképességű, ugyanakkor alkalmas az egymással közeli rokonságban álló törzsek azonosítására is, így filogenetikai tanulmányokhoz és járványtani nyomozásra egyaránt használható. A rendszer érzékenysége lehetővé teszi közvetlenül klinikai mintákból kivont DNS-ek vizsgálatát is.

Ad 2. A tervezett MLST rendszerrel vizsgált *M. gallisepticum* törzsek nagy genetikai változatosságot mutattak. Eredményeink arra utalnak, hogy a különböző *M. gallisepticum* törzsek elterjedésében meghatározó szerepet tölt be az intenzív nemzetközi kereskedelem. Az adatok emelett bizonyították, hogy egymással közeli filogenetikai kapcsolatban álló *M. gallisepticum* törzsek képesek megfertőzni házi szárnyasokat és vadon élő madarakat egyaránt, utóbbiak tehát lehetséges fertőzési forrásai a baromfiféléknek.

Ad 3. Összesen nyolc, pontmutációk kimutatására alkalmas MAMA rendszert fejlesztettünk, hogy lehetővé tegyük a *M. gallisepticum* vakcinatörzsek vad

izolátumoktól való egyszerű, gyors és költséghatékony elkülönítését, mely módszer sikerrel alkalmazható lehet a rutin diagnosztikában, a vakcinázási és mentesítési programok hatékonyságának ellenőrzésében.

Ad 4. A tervezett MLST és MAMA rendszerek eredményei nagyfokú egyezést mutattak a vakcinatörzsek vad izolátumoktól való elkülönítésében, igazolva ezzel a módszerek megbízhatóságát. Mindazonáltal, az MLST rendszer képes volt elkülöníteni a ts-11 és 6/85 vakcinatörzsektől azokkal közeli filogenetikai kapcsolatban álló izolátumokat is, melyek MAMA tesztekkel vakcinatörzsnek bizonyultak, vagy bizonytalan eredményeket adtak. A MAMA tesztek eredményeinek kérdésessége esetén ezért az MLST módszer használata javasolt.

Ad 5. *M. synoviae* törzsek fluorokinolon-, makrolid- és linkomicin-rezisztenciájával korábban már összefüggésbe hozott, vagy korábban már leírt, ám csökkent antibiotikum-érzékenységgel összefüggésbe eddig nem hozott molekuláris markereket találtunk a vizsgált *M. synoviae* törzsek genomjában. Emellett új, feltehetően rezisztencia-kapcsolt mutációkat azonosítottunk a *gyrA*, *gyrB*, *parC* és *parE* génekben.

Tudományos publikációk

Az értekezés témájához kapcsolódó lektorált publikációk

Bekő, K., Gyuranecz, M.: **Baromfiállományok *Mycoplasma gallisepticum* okozta fertőzései - *Mycoplasma gallisepticum* infections in poultry**, Magy. Állatorv. Lapja, 142, 349-364, 2020.

Bekő, K., Gyuranecz, M.: ***Mycoplasma synoviae* okozta baromfi betegségek - Poultry diseases caused by *Mycoplasma synoviae***, Magy. Állatorv. Lapja, 142, 17-28, 2020.

Bekő, K., Kreizinger, Z., Kovács, Á.B., Sulyok, K.M., Marton, S., Bányai, K., Catania, S., Feberwee, A., Wiegel, J., Dijkman, R., ter Veen, C., Lysnyansky, I., Gyuranecz, M.: **Mutations potentially associated with decreased susceptibility to fluoroquinolones, macrolides and lincomycin in *Mycoplasma synoviae***, Vet. Microbiol., 248, 108818, 2020.

Bekő, K., Kovács, Á.B., Kreizinger, Z., Marton, S., Bányai, K., Bánáti, L., Catania, S., Bradbury, J., Lysnyansky, I., Olaogun, O.M., Gyuranecz, M.:

Development of mismatch amplification mutation assay (MAMA) for the rapid differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* K vaccine strain from field isolates, Avian Pathol., 49, 317-324, 2020.

Bekő, K.*, Sulyok, K.M.*, Kreizinger, Z.*, Forró, B., Marton, S., Bányai, K., Catania, S., Ellis, C., Bradbury, J., Olaogun, O.M., Kovács, Á.B., Cserép, T., Gyuranecz, M.: **Development of molecular methods for rapid differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains from field isolates**, J. Clin. Microbiol., 57, e01084, 2019.

Bekő, K., Kreizinger, Z., Sulyok, K.M., Kovács, Á.B., Gróznér, D., Catania, S., Bradbury, J., Lysnyansky, I., Olaogun, O.M., Czanik, B., Ellakany, H., Gyuranecz, M.: **Genotyping *Mycoplasma gallisepticum* by multilocus sequence typing**, Vet. Microbiol., 231, 191-196, 2019.

Morrow, C.J., Kreizinger, Z., Achari, R.R., Bekő, K., Yvon, C., Gyuranecz, M.: **Antimicrobial susceptibility of pathogenic mycoplasmas in chickens in Asia**, Vet. Microbiol., 250, 108840, 2020.

Egyéb lektorált publikációk

Bekő, K., Kreizinger, Z., Yvon, C., Saller, O., Catania, S., Feberwee, A., Gyuranecz, M.: **Development of molecular assays for the rapid and cost-effective determination of fluoroquinolone, macrolide and lincosamide susceptibility of *Mycoplasma synoviae* isolates**, PLoS One, 15, e0241647, 2020.

Bekő, K., Felde, O., Sulyok, K.M., Kreizinger, Z., Hrivnák, V., Kiss, K., Biksi, I., Jerzsele, Á., Gyuranecz, M.: **Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma hyorhinis* strains isolated from swine in Hungary**, Vet. Microbiol., 228, 196-201, 2019.

Bekő, K., Koványi, B., Göloncsér, F., Horváth, G., Dénes, Á., Környei, Z., Botz, B., Helyes, Z., Müller, C.E., Sperlág, B.: **Contribution of platelet P2Y₁₂ receptors to chronic Complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain**, J. Thromb. Haemost., 15, 1223-1235, 2017.

Hornok, S., Szekeres, S., Horváth, G., Takács, N., Bekő, K., Kontschán, J., Gyuranecz, M., Tóth, B., Sándor, A.D., Juhász, A., Beck, R., Farkas, R.: **Diversity of tick species and associated pathogens on peri-urban wild boars - first report of the zoonotic**

- Babesia cf. crassa*** from Hungary, Ticks Tick Borne Dis., 2012. [közlésre benyújtva]
- Kovács, Á.B., Wehmann, E., Sváb, D., Bekő, K., Gróznér, D., Mitter, A., Bali, K., Morrow, C.J., Bányai, K., Gyuranecz, M.: **Novel prophage-like sequences in *Mycoplasma anserisalpingitidis***, Infect. Genet. Evol., 2021. [közlésre benyújtva]
- Gróznér, D., Kovács, Á.B., Wehmann, E., Kreizinger, Z., Bekő, K., Mitter, A., Sawicka, A., Jánosi, S., Tomczyk, G., Morrow, C.J., Bányai, K., Gyuranecz, M.: **Multilocus sequence typing of geese pathogen *Mycoplasma anserisalpingitidis***, Vet. Microbiol., 254, 108972, 2021.
- Földi, D., Bekő, K., Kreizinger, Z., Felde, O., Kovács, Á.B., Tóth, F., Bányai, K., Gyuranecz, M.: **Genotyping *Mycoplasma hyorhinis* by multi-locus sequence typing and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis**, Vet. Microbiol., 249, 108836, 2020.
- Horváth, G., Otrókocsi, L., Bekő, K., Baranyi, M., Kittel, Á., Fritz-Ruenes, P.A., Sperlágh, B.: **P2X7 receptors drive poly(I:C) induced autism-like behavior in mice**, J. Neurosci., 39, 2542-2561, 2019.

- Kreizinger, Z., Sulyok, K.M., Bekő, K., Kovács, Á.B., Grózner, D., Felde, O., Marton, S., Bányai, K., Catania, S., Benčina, D., Gyuranecz, M.: **Genotyping *Mycoplasma synoviae*: Development of a multi-locus variable number of tandem-repeats analysis and comparison with current molecular typing methods**, Vet. Microbiol., 226, 41-49, 2018.
- 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., 213, 47-57, 2018.
- Hornok, S., Corduneanu, A., Kontschán, J., Bekő, K., Szőke, K., Görföl, T., Gyuranecz, M., Sándor, A.D.: **Analyses of separate and concatenated *cox1* and 18S rRNA gene sequences indicate that the bat piroplasm *Babesia vesperuginis* is phylogenetically close to *Cytauxzoon felis* and the 'prototheilerid' *Babesia conradae***, Acta Vet. Hung., 66, 107-115, 2018.

- Kreizinger, Z., Sulyok, K.M., Gróznér, D., Bekő, K., Dán, Á., 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.
- Beamer, E., Göloncsér, F., Horváth, G., Bekő, K., Otrokocsi, L., Koványi, B., Sperlág, B.: **Purinergic mechanisms in neuroinflammation: An update from molecules to behavior**, Neuropharmacology, 104, 94-104, 2016.

Köszönetnyilvánítás

Elsőként témavezetőmnek, Gyuranecz Miklósnak szeretnék köszönetet mondani az évek során nyújtott rengeteg szakmai segítségért, támogatásért és emberi hozzáállásáért.

Hálás vagyok jelenlegi és korábbi kollégáimnak, Görföl-Sulyok Kingának, Gróznér Dénesnek, Kovács Áronnak, Hrivnák Veronikának, Saller Orsolyának, Yvon Cécilének, Stammné Felde Orsolyának, Földi Dorottyának, Mitter Alexának és Wehmann Enikőnek kedvességükért, segítőkészségükért és a vidám hangulatért. Különleges köszönet illeti Kreizinger Zsuzsát kutatási tapasztalatainak készséges megosztásáért, mindenkori segítségéért, és a hasznos konzultációkért.

Szeretnék köszönetet mondani konzulensemnek, Bányai Krisztiánnak a PhD munkám során nyújtott bölcs tanácsokért, és a teljes genom szekvenálások lehetővé tételéért. Köszönöm Forró Barbarának, Marton Szilviának, Kaszab Eszternek és Bali Krisztinának a szekvenálási munkában való részvételüket.

Köszönet illeti Janet Bradbury, Salvatore Catania, Anneke Feberwee, Inna Lysnyansky, Chris Morrow és

Martins Olaogun szerzőtársaimat a mintagyűjtésben és az adatok értelmezésében nyújtott segítségükért.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném megköszönni a családomnak a szeretetteljes támogatást és biztatást.

A kutatást a Lendület (LP2012-22), K_16 (119594), FK_17 (124019) és KKP19 (129751) pályázatok támogatták.