

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**VÍZIBAROMFIT FERTŐZŐ *MYCOPLASMA*
FAJOK ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉGE ÉS
GENOMIKAI VIZSGÁLATA**

Grózner Dénes

Témavezető: Dr. Gyuranecz Miklós



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2021.

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

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

Dr. Magyar Tibor, Ph.D., D.Sc.
Agrártudományi Kutatóközpont
Állatorvos-tudományi Intézet
témabizottsági tag

Dr. Dán Ádám, Ph.D.
DaNAm Vet. Molbiol Bt.
témabizottsági tag

.....

Gróznér Dénes

Bevezetés

A *Mycoplasma anserisalpingitidis*, *M. anatis*, *M. anseris* és *M. cloacale* ludakban és kacsákban a normál mikroflóra részeként előforduló, fakultatív patogén baktériumok. A mycoplasmosis kórkép kialakulásához többnyire hajlamosító tényezők szükségesek (pl. nem megfelelő tartási körülmények, túlzott stressz); jellemző a kloáka és a nemi szervek gyulladása, a csökkent tojástermelés, a megnövekedett embrióelhalás, továbbá légzőszervi és idegrendszeri tünetek is mutatkoznak. A ludak és kacsák mycoplasmák okozta megbetegedése jelentős gazdasági károkat idéz elő világszerte, a hazai libaágazatban az egyik legnagyobb veszteséget a *M. anserisalpingitidis* okozza.

A vízibaromfi patogén *Mycoplasma* fajok okozta fertőzés megelőzésére jelenleg nem áll rendelkezésre hatékony vakcina, ezért a megfelelő tartási körülmények és célzott antibiotikum terápia a védekezés legfőbb eszközei. A mycoplasmosis ellen a kinolon, tetraciklin, makrolid és pleuromutilin csoportba tartozó antibiotikumok bizonyulnak hatékonyak, azonban a különböző eredetű izolátumok antibiotikum érzékenysége jelentős mértékben eltérhet egymástól. A vízibaromfi *Mycoplasma* izolátumok antibiotikum érzékenységéről kevés információval

rendelkezünk, eddig egyetlen tanulmányban található erre vonatkozó adatok.

A korszerű molekuláris biológiai vizsgálatok megkövetelik a kórokozó teljes genetikai állományának ismeretét, azonban vizsgálataink előtt egyik tárgyalt *Mycoplasma* fajnak sem volt elérhető a teljes genom szekvenciája. Hosszabb-rövidebb genomrészeket vagy csak egyes gének szekvenciái álltak rendelkezésünkre, ezek összehasonlító bioinformatikai elemzésekre nem voltak alkalmasak. A teljes genom szekvenciák meghatározásával új lehetőségek nyílnak meg a vízibaromfi patogén *Mycoplasma* fajok kutatásában.

A vízibaromfi patogén *Mycoplasma* fajok gyakran együtt fordulnak elő a gazdaállatokban, azonban a fajszintű azonosításuk - a hasonló morfológiai, tenyésztési és biokémiai tulajdonságaik miatt - a rutin állatorvosi diagnosztika számára nehezen kivitelezhető. A vizsgált mycoplasmák fajszintű meghatározása a *Mycoplasma* nemzetség-specifikus polimeráz láncreakció (PCR) termékének szekvenálását igényli, ami szintén nem tartozik a rutin vizsgálatok közé. Továbbá ez a módszer sem ad választ a fajok pontos kilétéről, ha a vizsgált állományt több *Mycoplasma* faj is megfertőzi. A faj-specifikus PCR-rendszerek fejlesztése biztosítaná a vízibaromfit fertőző

mycoplasmák pontos, megbízható kimutatását. A *M. anatis*, *M. anseris* és *M. cloacale* esetében eddig nem álltak rendelkezésre ilyen rendszerek, a szakirodalomból ismert *M. anserisalpingtonis*-specifikus PCR fejlesztése pedig nem bizonyult teljes körű vizsgálatnak.

A *M. anserisalpingtonis* rendszeresen előfordul Közép- és Kelet-Európa országaiban, továbbá nemrég mutatták ki Kínában is. Ennek ellenére nem áll rendelkezésünkre olyan módszer, amivel vizsgálni lehet a *M. anserisalpingtonis* tér- és időbeli elterjedését. A multilókusz szekvencia tipizálás (MLST) megfelelő eszköz lehet a vizsgált minták közötti genetikai kapcsolatok kimutatására, ezáltal lehetőség nyílik a leszármazási viszonyok feltárására és járványügyi nyomozásra egyaránt.

Célkitűzések

Az értekezés célkitűzései:

Ad 1. a hazai *M. anserisalpingitidis* klinikai izolátumok *in vitro* antibiotikum érzékenységi profiljának meghatározása tizenhárom antibiotikummal és egy antibiotikum kombinációval szemben.

Ad 2. a *M. anserisalpingitidis*, *M. anatis*, *M. anseris* és *M. cloacale* típus törzsek és két *M. anserisalpingitidis* klinikai izolátum *de novo* teljes genom szekvenálása.

Ad 3. a *M. anserisalpingitidis*, *M. anatis*, *M. anseris* és *M. cloacale* fajok kimutatására alkalmas PCR rendszerek tervezése.

Ad 4. MLST módszer fejlesztése és *M. anserisalpingitidis* törzsek filogenetikai vizsgálata.

Anyag és módszer

***M. anserisalpingitidis* antibiotikum érzékenységeinek meghatározása**

A *M. anserisalpingitidis* antibiotikum érzékenységeinek meghatározásához 38 klinikai izolátumot vontunk be a vizsgálatainkba. A baktérium törzseket (egy minta kivételével) ludakból izoláltuk; a mintagyűjtést Magyarországon 2011 és 2015 között, az állatok számos szervéből végeztük. Az izolátumok antibiotikum érzékenységi profilját leves mikrohígításos módszerrel állapítottuk meg fluorokinolonokkal (enrofloxacin, difloxacin, norfloxacin), aminoglikoziddal (spektinomycin), linkozamiddal (linkomicin), tetraciklinekkel (doxiciklin, oxitetraciklin), makrolidokkal (tilmikoizin, tilozin, tilvalozin), pleuromutilinekkal (tiamulin, valnemulin), fenikollal (florfenikol) és a linkomicin-spektinomycin kombinációjával szemben. A minimális gátló koncentráció (MIC) értéknek azt a legkisebb antibiotikum koncentrációt vettük, amelynél már nem tapasztaltunk pH- és színváltozást a táplevesben, ami a baktériumok szaporodásának gátlására utalt. Meghatároztuk továbbá a vizsgált minták 50%-ának és 90%-ának gátlásához szükséges legkisebb antibiotikum koncentrációkat (MIC₅₀ és MIC₉₀ értékek) is.

Vízibaromfi *Mycoplasma* törzsek/izolátumok *de novo* szekvenálása

M. anserisalpingitidis (ATCC BAA-2147, MYCAV 93, MYCAV 177), *M. anatis* (NCTC 10156), *M. anseris* (ATCC 49234) és *M. cloacale* (NCTC 10199) típus-törzseket és klinikai izolátumokat szekvenáltuk Illumina MiSeq és/vagy NextSeq 500 készülékkel (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). A nyers adatokból SPAdes Genome Assembler 3.11 szoftver segítségével kontigokat alakítottunk ki. A genomok annotálásához online elérhető szoftvereket használtunk. A *Mycoplasma* típus-törzsek teljes genom illesztését Mauve 2.3.1 szoftverrel végeztük.

Faj-specifikus PCR tervezés

A *M. anserisalpingitidis*, *M. anatis*, *M. anseris* és *M. cloacale* faj-specifikus PCR tervezéséhez a minimális mycoplasma génkészlet (core genome) listájából véletlenszerűen válogattunk ki háztartási géneket a típus-törzsek genomjaiból. A gének szekvenciáit a Geneious szoftverrel elemeztük és olyan, a primer tervezésre alkalmas génszakaszokat kerestünk, amelyek eleget tesznek a következő feltételeknek: (i) a vizsgált gén tartalmazzon két olyan szekvenciarészletet (primer régiók), ami faj-specifikus nukleotid szubsztitúciókat hordoz, (ii) a két primer régió közötti távolság 500-1000 bp legyen, (iii) a kiválasztott faj-

specifikus PCR mutassa ki a vizsgált *Mycoplasma* faj összes izolátumából a célszekvenciát, de más *Mycoplasma* faj esetében ne legyen amplifikáció.

A faj-specifikus PCR rendszereket *M. anserisalpingitidis* (n=18), *M. anatis* (n=8), *M. anseris* (n=13) és *M. cloacale* (n=18) klinikai izolátumokon ellenőriztük. Meghatároztuk a faj-specifikus PCR-k specificitását és érzékenységét, továbbá a *Mycoplasma* nemzetség-specifikus és a tervezett faj-specifikus PCR rendszerek eredményeit összehasonlítottuk 28 klinikai DNS minta vizsgálatával és egyes nemzetség- vagy faj-specifikus PCR-termékek bázissorrendjét is meghatároztuk.

***M. anserisalpingitidis* MLST vizsgálat**

Magyar, lengyel, ukrán, kínai és vietnámi *M. anserisalpingitidis* mintákat gyűjtöttünk házi ludakból, hattyúludakból és házi kacsákból, 1983 és 2019 között (n=89). A mintagyűjteményben 36 klinikai izolátum egy magyar állattenyésztési integrációtól származott. Számos izolátumot ugyanazon telep különböző istállóiból vagy ugyanazon állat különböző szerveiből gyűjtöttünk.

A klinikai izolátumokat NextSeq 500 Illumina készüléken szekvenáltuk meg. A nyers szekvenciákat Geneious szoftverben illesztettük a referens genomhoz. Korábbi *Mycoplasma* MLST publikációk és random válogatás alapján

40 *M. anserisalpingtonis* háztartási gént vontunk be vizsgálatunkba. A korábbi MLST tanulmányok alapján a következő feltételeknek kellett teljesülnie ahhoz, hogy egy adott gén az MLST-re alkalmas legyen: (i) a vizsgált gén szerepeljen az összes *M. anserisalpingtonis* izolátum genomjában, (ii) a gén tartalmazzon konzervált régiókkal körülhatárolt erősen diverz szakaszt, (iii) a kiválasztott szakasznak minél magasabb legyen a Simpson-féle diverzitási indexe, (iv) az ampikon mérete 300-600 bp legyen, (v) a kiválasztott gének eloszlása egyenletes legyen a genomban, továbbá (vi) a primerek lehetőleg faj-specifikusak legyenek.

Meghatároztuk a minták szekvencia típusát (ST) az egyedi lókuszok allélvariációi alapján. A konkatenált szekvenciákból elkészítettük a *M. anserisalpingtonis* minták leszármazási fáját, a filogenetikai vizsgálatokban a fa gyökereztetéséhez külcsoportként (outgroup) *M. anatis* mintákat használtunk. A fát MEGA X 10.0.5 szoftver segítségével, Maximum Likelihood módszerrel készítettük el.

Eredmények

***M. anserisalpingitidis* antibiotikum érzékenységeinek meghatározása**

Az enrofloxacin és difloxacin alkalmazásakor széles skálán tapasztaltunk MIC értékeket (1,25->10 µg/ml), míg az összes vizsgált *M. anserisalpingitidis* izolátum szaporodását csak nagyon magas norfloxacin koncentrációval tudtuk gátolni (≥ 10 µg/ml). Néhány izolátumot még a legnagyobb alkalmazott linkomicin és spektinomycin koncentráció sem gátolta, a MIC₉₀ értékek 8 µg/ml, illetve 32 µg/ml voltak. A linkomicin-spektinomycin kombináció alkalmazásakor a MIC₅₀ és MIC₉₀ érték 4 µg/ml volt. Tetraciklin kezeléskor széles skálán mértünk MIC értékeket; 2->64 µg/ml az oxitetraciklinnel és 0,078->10 µg/ml a doxiciklinnel végzett vizsgálatban. A MIC₅₀ és MIC₉₀ értékek magasak voltak (>64 µg/ml és >10 µg/ml). A legnagyobb változatosságot a tilozin és tilmikozin MIC értékeiben tapasztaltuk ($\leq 0,25$ ->64 µg/ml), azonban magasak voltak a MIC₅₀ és MIC₉₀ értékek. A vizsgált makrolidok közül a tilvalozinnak volt a legkisebb a MIC₅₀ értéke (0,5 µg/ml). A két pleuromutilin közül a tiamulin kezelés során mértünk magasabb MIC₅₀ (0,625 µg/ml) és MIC₉₀ (1,25 µg/ml) értéket. Vizsgálatainkban a valnemulin bizonyult a leghatásosabb antibiotikumnak a *M. anserisalpingitidis* izolátumok

szaporodásának gátlására (MIC₅₀: ≤0,039 µg/ml; MIC₉₀: 0,078 µg/ml). A florfenikol a MIC₅₀/MIC₉₀ koncentrációval (8 µg/ml) gátolta a legtöbb izolátumot. Egyazon telep későbbi izolátumaival szemben magasabb MIC értékeket mértünk néhány antibiotikum (pl. tilozin, tilmikozin, tilvalozin) esetében.

Vízibaromfi *Mycoplasma* törzsek/izolátumok *de novo* szekvenálása

A *M. anserisalpingitidis* és *M. anatis* típus törzsek és klinikai izolátumok teljes genom mérete körülbelül 910.000-960.000 bp, a *M. anseris* típus törzse 750.000 bp, a *M. cloacale* genomja pedig 660.000 bp volt; G+C tartalom 26,4-27,0% között alakult. A nyers leolvasásokat és az annotált genomokat (azonosítók: CP042295, CP041663, CP041664, CP030141, CP030140 és CP030103) feltöltöttük a GenBank adatbázisába.

Az aminosav és szénhidrát metabolizmussal összefüggő gének hasonló arányban voltak jelen a *M. anserisalpingitidis* és *M. anatis*, illetve a *M. anseris* és *M. cloacale* típus törzsek genomjaiban.

A *M. anserisalpingitidis* és *M. anatis* típus törzsek teljes genom illesztése hosszabb homológ szakaszokat állapított meg, mint a *M. anseris* és *M. cloacale* genomok illesztésekor.

Faj-specifikus PCR tervezés

A vizsgált *Mycoplasma* fajok 8 génjére 17 faj-specifikus primerpár kombinációt terveztünk, amelyek közül azokat a PCR tesztekét választottuk ki, amelyek nem mutattak keresztreakciót a vizsgált fajok izolátumai között és a legjobb érzékenységgel rendelkeztek. A *M. anserisalpingitidis*-specifikus PCR-hez az *rpoB* gént célzó tesztet választottuk ki (szenszitivitás 10^2 DNS templát), a *M. anatis*- és *M. cloacale*-specifikus PCR-nél a *dnaX* génre tervezett primer párokat találtuk a legmegfelelőbbnek (szenszitivitás 10^2 DNS templát mindkét teszt esetében), a *M. anseris*-specifikus PCR-hez pedig a *pcrA* génre tervezett tesztet választottuk ki (szenszitivitás 10^1 DNS templát). Több vízibaromfi mycoplasma DNS együttes előfordulása a mintában nem befolyásolta a tesztek specificitását.

Amikor *M. anserisalpingitidis* / *M. anatis* és *M. anseris* / *M. cloacale* DNS is jelen volt a klinikai mintákban, a *Mycoplasma* nemzetség-specifikus PCR legtöbbször két amplikon jelenlétét mutatta ki, viszont pár minta esetében sem az amplikonok száma, sem pedig a szekvencia analízis nem utalt társfertőzésre. Az általunk tervezett faj-specifikus PCR rendszerek megbízhatóan azonosították a *Mycoplasma* fajokat ezekben a mintákban.

***M. anserisalpingitidis* MLST vizsgálata**

Az előzetes feltételek alapján az *atpG*, *fusA*, *pgiB*, *plsY* és *uvrA* gének bizonyultak a legmegfelelőbbnek a *M. anserisalpingitidis* MLST elemzésekhez. A vizsgálatba bevont 89 mintánál 76 egyedi ST-t különböztettünk meg 0,994 Simpson-féle diverzitási index értékkel. Eredményeinket publikus adatbázisban rögzítettük (PubMLST: <https://pubmlst.org/manserisalpingitidis/>).

A leszármazási fán három kládot (A-C), a C kládon belül pedig 6 szubkládot állapítottunk meg. Az A kládban lévő *M. anserisalpingitidis* minták *plsY* génje 100%-ban a *M. anatis* izolátumok *plsY* génjére hasonlított és ezek a minták helyezkedtek el legközelebb a *M. anatis* outgroup-hoz. A B klád és a C1 szubklád főleg kelet-magyarországi mintákat tartalmazott. Az ukrán minta és egy magyar ST alkották a 2C szubkládot. Az ATCC BAA-2147 típus törzs a 3C szubkládba került. A 4C szubklád mintái Magyarország több régiójából származtak. Három magyar, a két kínai és a vietnámi izolátumok alkották az 5C szubkládot. A leszármazási fán ez a szubklád mutatta a legnagyobb genetikai távolságot a C klád többi csoportjától. A 6C szubkládba került az összes lengyel minta és egy magyar ST. A vizsgált állattenyésztési integrációtól származó minták három kládba/szubkládba csoportosultak (A, B és 1C).

Megbeszélés

***M. anserisalpingitidis* antibiotikum érzékenységének meghatározása**

A vizsgált *M. anserisalpingitidis* izolátumokkal szemben mért fluorokinolon MIC értékek magasabbak voltak, mint a korábban közölt értékek. Ez megerősíti azt a megállapítást, hogy a legtöbb *Mycoplasma* fajban emelkedik a kinolonokkal szembeni rezisztencia megjelenése. Alacsonyabb MIC értékeket értünk el a linkomicin-spektinomycin kombináció alkalmazásakor, mint amikor külön-külön alkalmaztuk a két antibiotikumot az izolátumok szaporodásának gátlására. Habár az oxitetraciklin és doxiciklin MIC értékei széles skálán változtak, mégis mindkét antibiotikum MIC₉₀ értéke elérte a legnagyobb alkalmazott koncentrációt. Az eredmények utalhatnak arra, hogy Magyarországon többségében vannak a tetraciklinekkel kevésbé gátolható *M. anserisalpingitidis* törzsek. Tilozin és linkomicin alkalmazásakor tapasztaltuk a legnagyobb változatosságot a MIC értékekben, azonban a tilozin MIC₅₀ értéke magasabb volt, mint a korábban közölt érték, továbbá mindkét antibiotikum MIC₉₀ értéke szintén elérte a legnagyobb alkalmazott koncentrációt. A három makrolid közül a tilvalozin bizonyult hatásos szernek a *M. anserisalpingitidis* izolátumokkal szemben. *In vitro* vizsgálatainkban a

pleuromutilinek bizonyultak a leghatásosabb antibiotikum csoportnak; különösképpen a valnemulin mutatott alacsony MIC értékeket. Florfenikolos kezelésben nem tapasztaltunk rendkívül kiugró eredményeket.

Annak háttérében, hogy ugyanazon telep későbbi izolátumait magasabb antibiotikum koncentrációkkal tudtuk gátolni, állhat az antibiotikumok következtelen felhasználása és a velük szemben kialakuló rezisztencia gyors megjelenése. Ezek az eredmények felhívják a figyelmet a *M. anserisalpingitidis* izolátumok antibiotikum érzékenységének meghatározására a gyógykezelés előtt és a felelősségteljes antibiotikum használatra.

Vízibaromfi *Mycoplasma* törzsek/izolátumok *de novo* szekvenálása

A *M. anserisalpingitidis*, *M. anatis*, *M. anseris* és *M. cloacale* típus törzsek és klinikai izolátumok genom mérete és G+C tartalma a mycoplasmákra jellemző értékeket mutattak.

Az aminosav és szénhidrát metabolizmusban szerepet játszó gének száma összhangban volt a *M. anserisalpingitidis* és *M. anatis* glükózt fermentáló, illetve a *M. anseris* és *M. cloacale* arginint hidrolizáló anyagcseréjével.

A *M. anserisalpingitidis* és *M. anatis* típus törzsek genomjainak hosszan átfedő régiói megerősítik a feltételezést, hogy a két baktérium faj szoros rokonságban áll egymással és egy közös őstől származhatnak. A *M. anseris* és *M. cloacale* típus törzsek genomjai között szintén vannak homológ szekvenciák, azonban a rövidebb méretük és a nagyfokú átrendezettségük arra is utal, hogy ezek egymástól jobban elkülönült fajok lehetnek.

A publikussá tett *M. anserisalpingitidis*, *M. anatis*, *M. anseris* és *M. cloacale* genomok világszerte alapot adhatnak új tudományos munkák tervezéséhez.

Faj-specifikus PCR tervezés

A klinikai mintákon végzett eredmények alapján elmondhatjuk, hogy kevert fertőzés esetén a tervezett faj-specifikus PCR rendszerek alkalmazásával pontosan megállapítottuk a mintában lévő mycoplasmák fajtát és számát, míg ez bonyolult vagy kivitelezhetetlen volt a nemzetség-specifikus PCR rendszer használatával.

A tervezett faj-specifikus PCR rendszerek segítségével új vagy csak ritkán leírt gazdafajokban mutattuk ki/erősítettük meg a vizsgált mycoplasmákat. A világon elsőként izoláltunk *M. anserisalpingitidis*-t kacsából, a korábbi közlemények csak ludakból szóló izolálást említettek. Megerősítettük a *M. anatis* ludakban való előfordulását, ez a kórokozó

legtöbbször kacsákat fertőz, az irodalomban ludakból történő izolálásról ritkán tesznek említést.

A tervezett faj-specifikus PCR rendszerek kiváló specificitással és érzékenységgel rendelkeznek, ezzel lehetővé tettük a *M. anserisalpingitidis*, *M. anatis*, *M. anseris* és *M. cloacale* fajok gyors és költséghatékony kimutatását a rutin állatorvosi diagnosztika számára.

***M. anserisalpingitidis* MLST vizsgálat**

A *M. anserisalpingitidis* MLST vizsgálatához a *M. anatis*-t választottuk outgroup-nak a két faj genomikai hasonlósága miatt. Az A kládban lévő *M. anserisalpingitidis* minták és a *M. anatis* izolátumok között megfigyelt *plsY* egyezés megerősíti a két faj közös ősének elméletét.

A mycoplasmák az egyik leggyorsabban változó baktériumok, amely magyarázatot adhat a *M. anserisalpingitidis* minták genotípusának változatosságára. Azonban a nagyszámú ST ellenére is azt tapasztaltuk, hogy az azonos földrajzi helyről származó minták (pl. lengyel minták vagy azok a magyar izolátumok, amelyeket nem az integrációtól gyűjtöttünk) szoros kapcsolatot mutattak és azonos csoportba kerültek a leszármazási fán. A vizsgált állattenyésztési integráción belüli számos ST megjelenésének és a minták kládokba/szubkládokba való megoszlásának hátterében a

kórokozó telepek közötti fokozott horizontális terjedése/terjesztése állhat.

Figyelemreméltó, hogy az 5C szubkládba az ázsiai mintákon kívül magyar izolátumok is kerültek. A szubkládon belüli izolátumok rokonságára kutatócsoportunk egy másik tanulmánya is - egy kínai és az egyik magyar mintának teljes genomszekvenciáját meghatározva - felhívta a figyelmet. Mivel a *M. anatis* és a *M. cloacale* fajok jelenlétét már igazolták vadkacsákban, elképzelhető, hogy a *M. anserisalpingitidis* is képes terjedni vándorló vadmadarak útján és így állhatott elő a hasonlóság a két, földrajzilag igen távoli izolátum között.

Az újonnan felállított MLST rendszer megfelelő eszköznek bizonyult a *M. anserisalpingitidis* minták genotipizálására, ezáltal jobban megismerhetjük a faj leszármazását és terjedését. Folyamatos és széleskörű mintagyűjtéssel a jövőben járványügyi vizsgálatok is végezhetőek a módszer segítségével.

Új tudományos eredmények

Ad 1. Elsőként határoztuk meg *M. anserisalpingitidis* klinikai izolátumok *in vitro* antibiotikum érzékenységi profilját tizenhárom antibiotikummal és egy antibiotikum kombinációval szemben. Vizsgálataink alapján a pleuromutilin csoportba tartozó tiamulin és valnemulin, és a makrolid típusú tilvalozin bizonyultak a leghatékonyabb terápiás szernek a hazai *M. anserisalpingitidis* okozta fertőzések kezelésére. Számos izolátum szaporodását csupán magas antibiotikum koncentrációval tudtuk gátolni, amely felhívja a figyelmet a gyógykezelést megelőző antibiotikum érzékenység meghatározás fontosságára.

Ad 2. *De novo* teljes genom szekvenálás során meghatároztuk a *M. anserisalpingitidis* típus törzs (ATCC BAA-2147) és két klinikai izolátum (MYCAV 93 és MYCAV 177), valamint a *M. anatis* (NCTC 10156), *M. anseris* (ATCC 49234) és *M. cloacale* (NCTC 10199) típus törzsek bázissorrendjét. Elsőként töltöttünk fel ezekhez a fajokhoz teljes genomokat a GenBank-ba, ezzel elősegítve a vízibaromfi mycoplasmosis széleskörű kutatását.

Ad 3. Faj-specifikus PCR rendszereket terveztünk a vízibaromfiban leggyakrabban előforduló *Mycoplasma* fajok kimutatására. Elsőként írtunk le a *M. anatis*, *M. anseris* és *M. cloacale* fajokra specifikus PCR-eket, és elsőként

hoztunk létre olyan *M. anserisalpingtonis*-specifikus rendszert, amiben vizsgáltuk a specificitást és a szenzitivitást is. Az újonnan közölt tesztek gyorsan, egyszerűen és megbízhatóan azonosítják a baktérium fajokat, akár kevert klinikai mintából is. A *M. anserisalpingtonis*-specifikus PCR rendszer segítségével elsőként mutattuk ki kacsából a baktérium jelenlétét.

Ad 4. Nagyszámú mintát tartalmazó *M. anserisalpingtonis* gyűjtemény részleges adatokat szolgáltató (draft) genom szekvenálásából, majd háztartási gének *in silico* és *in vitro* elemzését követően elsőként terveztünk MLST módszert a faj genotipizálására. Az öt lókuszt vizsgáló rendszer a kutatásba bevont 89 *M. anserisalpingtonis* mintánál 76 egyedi ST-t különböztetett meg, amely a faj nagyfokú diverzitására utal. Eredményeinket publikus adatbázisban rögzítettük. A tervezett MLST módszer lehetővé teszi a *M. anserisalpingtonis* globális és hosszútávú elterjedésének vizsgálatát, alapját képezve további filogenetikai és járványügyi vizsgálatoknak.

Publikációs lista

A kutatás témájával kapcsolatban, lektorált tudományos folyóiratokban megjelent közlemények:

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 the goose pathogen *Mycoplasma anserisalpingitidis***, Vet. Microbiol. 254, 108972, 2021.

Gróznér, D., Forró, B., Kovács, Á.B., Marton, S., Bányai, K., Kreizinger, Z., Sulyok, K.M., Gyuranecz, M.: **Complete genome sequences of three *Mycoplasma anserisalpingitis* (*Mycoplasma* sp. 1220) strains**, Microbiol. Resour. Announc. 8e00985-19, 2019.

Gróznér, D., Gyuranecz, M., **Kacsák és ludak *Mycoplasma*-fertőzései**, Magyar. Állatorvosok Lapja 141, 495–504, 2019.

Gróznér, D., Sulyok, K.M., Kreizinger, Z., Rónai, Z., Jánosi, S., Turcsányi, I., Károlyi, H.F., Kovács, Á.B., Kiss, M.J., Volokhov, D., Gyuranecz, M.: **Detection of *Mycoplasma anatis*, *M. anseris*, *M. cloacale* and *Mycoplasma* sp. 1220 in waterfowl using species-specific PCR assays**, PLoS One 14, e0219071, 2019.

Grózner, D., Forró, B., Sulyok, K.M., Marton, S., Kreizinger, Z., Bányai, K., Gyuranecz, M.: **Complete genome sequences of *Mycoplasma anatis*, *M. anseris*, and *M. cloacale* type strains**, Microbiol. Resour. Announc. 7e00939-18, 2018.

Grózner, 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.

Egyéb, lektorált folyóiratokban megjelent tudományos közlemények:

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***, Infect. Genet. Evol. [közlésre benyújtva] 2021.

Kovács, Á.B., 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, 403, 2020.

Gyuranecz, M., Mitter, A., Kovács, Á.B., Grózner, D., Kreizinger, Z., Bali, K., Bányai, K., Morrow, C.J.: **Isolation of *Mycoplasma anserisalpingitidis* from swan goose (*Anser cygnoides*) in China**, BMC Vet. Res. 16, 178, 2020.

Volokhov, D. V., Grózner, D., Gyuranecz, M., Ferguson-Noel, N., Gao, Y., Stipkovits, L.: ***Mycoplasma anserisalpingitidis* sp. nov., isolated from European domestic geese (*Anser anser domesticus*) with reproductive pathology**, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 70, 2369-2381, 2020.

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

Nemes, C., Schvarcz, C., Simonyai, E., Turbók, J., Yvon, C., Grózner, D., Gyuranecz, M.: ***Mycoplasma iowae* fertőzés előfordulása egy előnevelt pulykaállományban**, Magyar Állatorvosok Lapja 141, 589-596, 2019.

Kreizinger, Z., Sulyok, K.M., Bekő, K., Kovács, Á.B., Gróznér, 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.

Kreizinger, Z., Gróznér, D., Sulyok, K.M., Nilsson, K., Hrivnák, V., Benčina, D., Gyuranecz, M.: **Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma synoviae* strains originating from Central and Eastern Europe**, BMC Vet. Res. 13, 342, 2017.

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.

Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném megköszönni témavezetőmnek, Gyuranecz Miklósnak az évek során nyújtott számos lehetőséget, ösztönzést és támogatást. Hálás vagyok, hogy tagja lehetek a Zoonótikus bakteriológia és mycoplasmatológia témacsoportnak.

Hálás vagyok Kreizinger Zsuzsának a vizsgálatokhoz és publikációkhoz nyújtott rengeteg tanácsért és segítségért.

Köszönet illeti volt és jelenlegi kollégáimat, különösképpen Görföl-Sulyok Kinga Máriát, Stammné Felde Orsolyát, Hrivnák Veronikát, Bekő Katinkát, Kovács Áron Botondot, Mitter Alexát, Földi Dorottyát, Vajzerné Saller Orsolyát és Wehmann Enikőt a munkám során nyújtott segítségükért, tapasztalataik megosztásáért és a baráti légkörért.

Köszönöm a témabizottsági tagoknak, Magyar Tibornak és Dán Ádámnak az évek során nyújtott segítségüket.

Hálás vagyok Bányai Krisztiánnak és csoportjának a minták szekvenálásában nyújtott segítségükért. Külön köszönettel tartozom Forró Barbarának a rengeteg bioinformatikai vizsgálatért.

Hálával tartozom Jánosi Szilárdnak, Rónai Zsuzsannának, Anna Sawicka-nak és Grzegorz Tomczyk-nak, hogy megosztották velünk értékes törzsgyűjteményüket. Dmitriy V. Volokhov-nak köszönöm, hogy javaslataival segítette a faj-specifikus PCR tervezést. Külön köszönet illeti Christopher J. Morrow-t, hogy segítette az ázsiai minták gyűjtését. Hálás vagyok mindazoknak, akik közbenjártak a minták és az izolátumok begyűjtéséhez.

Köszönöm szüleimnek, rokonaimnak és barátaimnak a támogatást és biztatást. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm feleségemnek, Dórának a türelmet és ösztönzést a dolgozat megírásának ideje alatt.

A vizsgálatokhoz az anyagi forrást a Magyar Tudományos Akadémia Lendület programja (LP2012-22) és a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal KKP19 Élvonal programja (129751) biztosította.