

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**MYCOPLASMA HYORHINIS IZOLÁTUMOK
ÖSSZEHASONLÍTÓ ELEMZÉSE ÉS A
KIVÁLTOTT BETEGSÉG
KÓRFEJLŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATA**

Földi Dorottya

Témavezetők: Dr. Gyuranecz Miklós és
dr. Kreizinger Zsuzsa



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2023

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....
Dr. Gyuranecz Miklós, D.Sc., Habil.
Állatorvostudományi Kutatóintézet
témavezető

.....
dr. Kreizinger Zsuzsa, Ph.D.
Állatorvostudományi Kutatóintézet
témavezető

dr. Makrai László, Ph.D.
Állatorvostudományi Egyetem
Járványtani és Mikrobiológiai tanszék
témabizottsági tag

dr. Wehmann Enikő, Ph.D.
Állatorvostudományi Kutatóintézet
témabizottsági tag

.....
Földi Dorottya

Bevezetés

A *Mycoplasma hyorhinis* egy fakultatív patogén baktérium, amit először Switzer írt le 1955-ben (Switzer, 1955). A *M. hyorhinis* elsősorban a savóshártyák és az ízületek gyulladását (Kobisch és Friis, 1996) okozza. Ritkább esetekben azonban fülgyulladást (Morita és mtsai., 1995), kötőhártyagyulladást (Resende és mtsai., 2019) és agyhártyagyulladást is kiválthat (Bünger és mtsai., 2020). A kórokozó nyálminták vizsgálata alapján az Egyesült Államokban az állományok 97%-ában fordul elő (Pillman és mtsai., 2019), míg Koreában ezt 66,1%-nak mérték (Cheong és mtsai., 2017). A *M. hyorhinis* egészséges állatok orrában is megtalálható, a baktériumközösség részét képezi (Switzer, 1955). A malacok a kocáktól fertőződnek, majd a battérián a malacok egymás között gyorsan terjesztik a baktériumot (Clavijo és mtsai., 2017; 2019; Roos és mtsai., 2019).

A klinikai tünetek jellemzően választási malacokban jelentkeznek. A választással járó stressz, az anyai ellenanyagok csökkenése vagy vírusos társfertőzések mind hozzájárulhatnak a tünetek megjelenéséhez és befolyásolják a fertőzés súlyosságát (Palzer és mtsai., 2015; Chen és mtsai., 2016b; Clavijo és mtsai., 2019). A

M. hyorhinis fertőzés klinikai tünetei és kórbonctani elváltozásai nem kórjelzők, ezért a baktérium kimutatása (jellemzően PCR segítségével) az elváltozásokból elengedhetetlen a megfelelő diagnózis felállításához (Assunção és mtsai., 2005; Resende és mtsai., 2019).

Elérhetőek PCR alapú tipizáló eljárások a *M. hyorhinis* izolátumok rokonsági viszonyainak meghatározására (Tocqueville és mtsai., 2014; Dos Santos és mtsai., 2016; Trüeb és mtsai., 2016; Clavijo és mtsai., 2019), azonban a pontosabb vizsgálatok elvégzéséhez szükséges új genotipizáló eljárások fejlesztése, melyek felbontóképessége és megbízhatósága meghaladja a korábbi rendszereket.

Európában nincs elérhető oltóanyag a *M. hyorhinis* okozta betegség megelőzésére, illetve mentes állományok fenntartása sem lehetséges. Így a megfelelő állategészségügyi állapot elérése mellett (Palzer és mtsai., 2015; Clavijo és mtsai., 2019), az egyetlen mód az elváltozások enyhítésére a gyógyszeres kezelés. A *M. hyorhinis* izolátumok érzékenyek a tetraciklinekkel, pleuromutilinekkel és fluorokinolonokkal szemben (Ter Laak és mtsai., 1991; Bekő és mtsai., 2019a; Rosales és mtsai., 2020). A csökkent makrolid- és linkomicin-érzékenység azonban elterjedt az izolátumok között (Kobayashi és mtsai., 1996b, 2005; Bekő és mtsai., 2019a).

Célkitűzések

Célul tűztük ki:

1. Tíz gyakran használt antibiotikum minimális gátló koncentráció értékeinek meghatározását 2019 és 2021 között gyűjtött európai országokból származó *M. hyorhinis* izolátumokkal szemben.
2. Rezisztencia markerek azonosítását a *M. hyorhinis* izolátumok genomjában. Illetve ezek azonosítására alkalmas molekuláris tesztek fejlesztését.
3. Különböző felbontóképességű genotipizáló rendszerek fejlesztését *M. hyorhinis* izolátumok jellemzésére.
4. Egy *M. hyorhinis* fertőzési modell kidolgozását a jövőbeli vakcina hatékonysági vizsgálatokhoz.

Anyag és módszer

Mintagyűjtés és izolálás

Munkánk során *Mycoplasma* folyékony tápközeget (Mycoplasma Experience Ltd., Bletchingley, United Kingdom) használtunk a *M. hyorhinis* tenyésztésére. Az izolátumok azonosítására *M. hyorhinis* specifikus PCR rendszereket használtunk (Assunção és mtsai., 2005; jelen munka) és a szennyező *Mycoplasma* fajok jelenlétét is PCR módszerrel vizsgáltuk (Lauerman és mtsai., 1995; Assunção és mtsai., 2005; Martinson és mtsai., 2018a; Wu és mtsai., 2019). Harmincnyolc hazai izolátum teljes genom szekvenciáját (WGS) Illumina módszer (Illumina Inc., San Diego, California, USA) segítségével határoztuk meg.

Antibiotikumérzékenység vizsgálat

Tíz gyakran használt antibiotikumot vizsgáltunk ebben a kutatásban: két tetraciklint (doxiciklin és oxitetraciklin), egy pleuromutilint (tiamulin), egy fenikolt (florfenikol), egy fluorokinolont (enrofloxacin), négy makrolidot (tilozin, tilikozin, tilvalozin és tularomicin) és egy linkozamidot (linkomicin). Az antibiotikumok minimális gátló koncentráció (MIC) értékeit leves mikorhígításos

módszerrel határoztuk meg 76 *M. hyorhinis* izolátummal szemben (két belga, 19 lengyel, 20 magyar, 15 német és 20 olasz). A MIC érték az a legalacsonyabb antibiotikum koncentráció, ahol nem tapasztaltunk színváltozást (növekedést) a növekedési kontroll színváltozásával egy időben (Hannan, 2000). A MIC₅₀ és MIC₉₀ értékek azok a legalacsonyabb koncentrációk amelyekkel a vizsgált izolátumok növekedésének fele és 90%-a gátolható (Hannan, 2000).

Mismatch amplification mutation assay

Emelkedett (H genotípus) és alacsony (L genotípus) MIC értékekkel összefüggő pontmutációkat (SNP) azonosítottunk az érzékenységgel-összefüggő génekben (23S rRNS és L4, L22 50S riboszóma fehérjék). Az SNP-k azonosítását a 38 WGS segítségével Geneious Prime szoftverben végeztük (verziószám: 2019.2.1; Kearse *et al.*, 2012). Az SNP kimutatására és a genotípusok elkülönítésére *mismatch amplification mutation* (MAMA) tesztet fejlesztettünk. A fejlesztett rendszer érzékenységét mind az L, mind a H genotípusra meghatároztuk. A rendszer validálására összesen 138 mintát használtunk (123 klinikai izolátum meghatározott MIC értékekkel és 15 klinikai DNS minta).

Genotipizáló rendszerek fejlesztése

Az MLST rendszer fejlesztéséhez a háztartási géneket más *Mycoplasma* fajokban leírt MLST rendszerek alapján gyűjtöttük össze (Manso-Silván és mtsai., 2012; Tocqueville és mtsai., 2014; Dijkman és mtsai., 2016; Ghanem és El-Gazzar, 2016; Trüeb és mtsai., 2016; Bekő és mtsai., 2019b). A génszakaszok kiválasztásánál a következő szempontokat vettük figyelembe: (1) a gén legyen jelen minden *M. hyorhinae* genomban, (2) a változékony belső régiókat konzervált határoló szekvenciák vegyék körbe, (3) a génszakaszok magas Simpson diverzitás értékkel rendelkezzenek, (4) a választott génszakaszok hossza alkalmas legyen Sanger-szekvenálásra és (5) a választott fragmentek a genomban egyenletesen helyezkedjenek el. A fejlesztett rendszer validálását 47 izolátum felhasználásával végeztük el (*M. hyorhinae* típus törzs, hat elérhető GenBank szekvencia és 40 klinikai izolátum, köztük 3 izolátum ugyanabból az állatból). A filogenetikai elemzést Maximum Likelihood módszerrel végeztük, Hasegawa-Kishino-Yano modellel a MegaX szoftverben (Kumar és mtsai., 2018).

Az MLVA tervezéshez a tandem ismétlődő régiókat a Tandem Repeat Finder program segítségével azonosítottuk (Benson, 1999). A lókuszok kiválasztásánál az ismétlődő szakasz hosszát (min. 12 bp) és az inzerciók és deléciók arányát (0%) vettük figyelembe. A fejlesztett rendszerrel 41 izolátum jellemzését végeztük el (az MLST-nél használt minták, kivéve a GenBank-i szekvenciákat). A minták csoportosítása Neighbour-Joining módszerrel történt a páronkénti távolságok alapján a MegaX szoftverben (Kumar és mtsai., 2018).

Genotipizáló rendszerek összehasonlítása

45 törzs (38 klinikai izolátum elérhető teljes genom szekvenciával, GenBank szekvenciák és a típus-törzs) MLST elemzését végeztük el az irodalomban elérhető rendszerekkel [publikált MLST: MLST_p (Tocqueville és mtsai., 2014; Trüeb és mtsai., 2016) és felszíni fehérjéket tartalmazó MLST: MLST_s (Clavijo és mtsai., 2019)]. A filogenetikai elemzést mindkét korábbi MLST esetén a MegaX szoftverben végeztük Maximum Likelihood módszerrel Tamura-3 modell alapján (Kumar és mtsai., 2018).

A három MLST rendszer összehasonlítását a gén fragmentek és a teljes szekvencia Simpson diverzitás értékei és filogenetikai szempontból informatív pozíciók számai alapján végeztük ugyanazt a 45 mintát alapul véve. A kapott törzsfák robusztusságát a 70% feletti bootstrap értéket kapó elágazások száma alapján hasonlítottuk össze. A járványtani adatok és a filogenetikai elemzés összefüggéseit egy telepről, több évből származó izolátum-sor alapján vizsgáltuk.

Fertőzési modell

Tizenhat, négyhetes malacot három egyforma átlagtömegű csoportra osztottunk. A fertőző anyagot (MycSu160: egy hazai *M. hyorhinis* izolátum) mindkét fertőzési napra frissen készítettük. Az IV-IV csoport (n=6) két egymást követő nap (D0 és D1) intravénásan (IV) kapta a fertőző anyagot. Az IV-IP csoport (n=6) keverten kapta a fertőző anyagot, D0 IV fertőzést, D1 intraperitoneális (IP) fertőzést kaptak. A fertőzési dózis az IV-IV csoportban $1,66 \times 10^7$ CCU/malac volt, míg az IV-IP csoport $2,86 \times 10^7$ CCU/malac dózist kapott. A kontroll csoport egyedeit (n=4) ezzel egyidejűleg steril táplevessel oltottuk.

Az állatokat mindennap megfigyeltük, a klinikai tüneteket és a testhőmérsékleteket feljegyeztük. Hetente kétszer vért vettünk és orrtampon mintát gyűjtöttünk, illetve a testtömegüket is lemértük. A savókban egy általunk fejlesztett teljes-sejt ELISA segítségével vizsgáltuk a *M. hyorhinis* ellen termelődő ellenanyagok mennyiségét. Az orrtampon mintákban pedig izolálással és PCR vizsgálattal néztük a *M. hyorhinis* jelenlétét. A boncolás során az elváltozásokat pontosztuk, és mintát gyűjtöttünk az ízületekből, a savóshártyákról, a kötőhártyáról, a tüdőből és az agyból. A mintákban tenyésztéssel és PCR-rel vizsgáltuk a *Mycoplasma* fajok jelenlétét, bakteriológiai tenyésztést és kórszövetteni elemzést végeztünk. A fertőzés után gyűjtött re-izolátumok genotipizálását a fejlesztett MLST és MLVA rendszerrel végeztük el. A kórszövetteni elváltozásokat súlyosságuk alapján szintén pontosztuk. A kórbonctani és kórszövetteni minták pontoszásának, a napi átlagos súlygyarapodásnak (ADWG) és az ELISA titereknek a különbségeit statisztikai módszerekkel is elemeztük az R program segítségével (R Core Team, 2021).

A kísérletet az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács PE/EA/746-7/2021 számú engedélyében támogatta.

Eredmények

Antibiotikumérzékenység meghatározása

Származásától függetlenül két féle MIC eloszlást tapasztaltunk a 76 vizsgált *M. hyorhinis* izolátumot vizsgálva. Bimodális MIC eloszlást írtunk le a vizsgált makrolidokra és linkomicinre, míg unimodális eloszlást tapasztaltunk a többi vizsgált antibiotikum esetében. A vizsgált izolátumokat alacsony koncentrációban gátolták a következő antibiotikumok: tiamulin (MIC_{90} 0,312 $\mu\text{g/ml}$), doxiciklin (MIC_{90} 0,078 $\mu\text{g/ml}$), oxitetraciklin (MIC_{90} 0,25 $\mu\text{g/ml}$), florfenikol (MIC_{90} 0,2 $\mu\text{g/ml}$). Az enrofloxacin pedig enyhén emelkedett koncentrációban volt hatékony (MIC_{90} 1,25 $\mu\text{g/ml}$). Emelkedett MIC értékeket tapasztaltunk a vizsgált izolátumok 42-56%-ában (32-43/76 izolátum) a használt makrolidokra és linkomicinre (32->64 $\mu\text{g/ml}$ kivéve tilvalozin: 5->10 $\mu\text{g/ml}$). Az országok között a MIC_{50} értékek összehasonlításakor tapasztaltunk különbséget makrolidok és linkomicin esetén. A hazai és lengyel izolátumok alacsonyabb MIC_{50} értékeket mutattak, mint a német és olasz izolátumok.

Mismatch amplification mutation assay

Csökkent makrolid és linkomicin érzékenységet tapasztaltunk a meghatározott MIC értékekkel rendelkező *M. hyorhina* izolátumok 43%-ában (61/123). Rezisztencia kapcsolt pontmutációk kereséséhez két 50S riboszóma fehérje (L4, L22) és a 23S rRNS gén szekvenciáját elemeztük. A riboszóma fehérjék szekvenciájában nem találtunk SNP-t, a 23S rRNS génben pedig egy transzverziót találtunk a 2066 pozícióban (A2058G pozíció az *E. coli* számozás szerint). A fejlesztett molekuláris teszt eredménye a legtöbb minta esetén megegyezett a leves mikrohígítási módszerrel kapott eredményekkel. Fals eredményeket három esetben tapasztaltunk (G-13, Po-4 és Po-9), ahol a molekuláris teszt L genotípust mutatott, szemben a leves mikrohígítási módszerrel, ahol emelkedett MIC értékeket tapasztaltunk. A klinikai minták esetében a MAMA teszt eredménye szintén megegyezett a megfelelő klinikai izolátum leves mikrohígítási módszerrel kapott eredményével.

Genotipizáló rendszerek fejlesztése

Hat génfragmentet választottunk ki az MLST fejlesztéshez (*lepA*, *rpoB*, *rpoC*, *gltX*, *uvrA* és *valS*). A kidolgozott *M. hyorhinis* specifikus MLVA szintén hat lókusz elemzésén alapul (Mhr205, Mhr396, Mhr438, Mhr441, Mhr442 and Mhr444). A fejlesztett genotipizáló rendszerek validálására ugyanazt a 41 izolátumot használtuk. Az MLST segítségével a vizsgált törzskéet 32 szekvenciatípusra (ST) bontottuk fel, míg az MLVA segítségével 38 genotípust tudtunk meghatározni. Az egy állatból származó izolátumokat egyik módszerrel sem tudtuk elkülöníteni. Néhány esetben az egy telepről különböző évekből származó izolátumok egy ST-t képviseltek vagy közeli rokon ST-ket alkottak az MLST rendszerben. Ugyanakkor találtunk olyan egy telepről származó izolátumokat is, amelyek nagyon eltérő ST voltak. Nem találtunk összefüggéseket az izolátumok eredete (szerv, izolálás éve) és a szekvencia- vagy genotípusok között.

Genotipizáló rendszerek összehasonlítása

A vizsgált 45 izolátum magas diverzitást mutatott mind a két korábban publikált (MLST_p, Tocqueville és mtsai., 2014; Trüeb és mtsai., 2016; és MLST_s, Clavijo és mtsai., 2019), mind az általunk fejlesztett MLST rendszerben (MLST_n; MLST_n: 38 ST; MLST_p: 31 ST és MLST_s: 32 ST).

A filogenetikai szempontból érdekes pozíciók aránya a teljes vizsgált szekvenciákban az MLST_s esetén volt a legmagasabb (8,12%), főleg az egyik sejt felszíni fehérjét kódoló gén, az *mtlD* magas variációjának (20,30%) köszönhetően. A filogenetikai szempontból érdekes pozíciók aránya az MLST_n esetén 1,24% volt, míg az MLST_p rendszerben 0,65%. A Simpson diverzitás értéke a teljes szekvencia tekintetében az MLST_n rendszernek volt a legmagasabb (0,986), míg az MLST_p 0,976 és az MLST_s 0,964 értéket mutatott. A filogenetikai fákat vizsgálva az MLST_n fán öt ág kapott 70% feletti bootstrap értéket, míg ez a szám az MLST_s esetén 12 volt az MLST_p rendszerben pedig nem találtunk ilyen elágazást. A vizsgált izolátumok járványtani hátterét az MLST_n rendszerrel kapott filogenetikai fa támasztotta leginkább alá.

Fertőzési modell

Az első klinikai tünetek (duzzadt csánk ízületek) hat nappal a fertőzés után jelentkeztek az IV-IP csoportban és két nappal később az IV-IV csoportban. Egyéb klinikai tünetek nem jelentkeztek a fertőzött csoportokban, illetve a kontroll csoportban egyáltalán nem tapasztaltunk elváltozásokat. Az ADWG az IV-IV csoportban 223 g, az IV-IP csoportban 170 g, míg a kontroll csoportban 350 g volt. A kontroll csoportban mért ADWG szignifikánsan magasabb volt, mint a fertőzött csoportokban tapasztalt.

A fertőző anyag beadása után mindkét fertőzött csoportban tapasztaltunk PCR pozitivitást; elször az IV-IP csoportban a fertőzést követő ötödik, majd az IV-IV csoportban is nyolcadik napon. A boncoláskor vett minták esetében a savóshártyákról (szívburok, hashártya, mellhártya) és a tüdőből gyűjtöttek csak az IV-IV csoportban mutattak PCR pozitivitást. Ezzel szemben mindkét fertőzött csoportban legalább egy mintából minden ízület esetén (könyök, lábtő, csánk, térd) ki tudtuk mutatni a *M. hyorhinae* jelenlétét PCR segítségével. Azonban az IV-IV csoportban valamennyivel több ízület mutatott pozitivitást. A kontroll csoportból gyűjtött mintákban a kísérlet alatt nem tudtuk kimutatni a *M. hyorhinae* jelenlétét. A re-izolátumok genotipizálása során

kiderült, hogy minden re-izolátum ugyanazt az MLST és MLVA típust mutatja, mint a fertőző törzs, két kivétellel az IV-IP csoportból. Ez a két re-izolátum egy MLVA lókuszon mutatott eltérést. Más kórokozó vagy sertés patogén *Mycoplasma* faj jelenléte nem volt kimutatható a boncoláskor vett mintákból.

Mindkét fertőzött csoportban legalább egy gyulladt ízületet találtunk a boncolás során. Az ízületgyulladást savós vagy gennyes gyulladás jellemezte, amit leggyakrabban a csánk (8/12) ízületben tapasztaltunk, ezt a könyök (6/12), a térd (5/12) és a lábtő (4/12) ízület követte egyik vagy mindkét oldalon. Kiterjedt, súlyos, krónikus szívburokgyulladást nagy mennyiségű kötőszövet jelenlétében két állat esetében tapasztaltunk mindkét csoportban. Emellett, enyhe vagy közepesen súlyos krónikus mellhártya- és hashártyagyulladást kötőszövetes nyúlványokkal három állat esetében észleltünk az IV-IV csoportban. A kontroll csoportban semmilyen kórbonctani elváltozást nem tapasztaltunk. A kórbonctani pontok mindkét fertőzött csoport esetében szignifikáns eltérést mutattak a kontroll csoporthoz képest, de egymástól nem tértek el.

A fő kórszövettani elváltozásokat az ízületekben, valamint a mell- és hasüreg parenchymás szerveit borító savóshártyákon tapasztaltunk. Az ízületekben a gyulladás minden esetben nyiroktüszők megjelenésével járt együtt az erek körül, illetve néhány esetben többmagvú óriássejtek megjelenését is tapasztaltuk. A savóshártyák esetében a kötőszövetes nyúlványok megjelenése volt jellemző, amelyet vagy gyulladás (néhány esetben többmagvú óriássejtekkel) vagy kiterjedt vastagodás kísért. A többmagvú óriássejteket az ízületekben és a mellhártyán ugyanabban az állatban észleltük az IV-IV csoportban. A statisztikailag szignifikáns különbséget tapasztaltunk az IV-IV csoport és a kontroll csoport között az ízületek és az összes szerv kórszövettani pontjainak vizsgálatakor.

A *M. hyorhinis* ellen termelt ellenanyag szintje mindkét fertőzött csoportban szignifikáns emelkedést mutatott a kontroll csoport állataihoz képest.

Megbeszélés

Antibiotikumérzékenység vizsgálat

Az állategészségügyi jelentőségű *Mycoplasma* fajok antibiotikumérzékenységének vizsgálata időigényes, speciális tapasztalatot igényel és a mai napig nem standardizált. Ezért sok esetben a célzott antibiotikum használat nem elérhető és a kezelésre használt szerek kiválasztása tapasztalati úton történik. Ebből kifolyólag elengedhetetlen friss és összehasonlítható MIC értékek biztosítása, azonban ezekből kevés található meg az irodalomban (Ter Laak és mtsai., 1991; Bekő és mtsai., 2019a; Rosales és mtsai., 2020).

Ennek pótlására végeztük el 76 európai (belga, lengyel, magyar, német és olasz) 2019 és 2021 között gyűjtött *M. hyorhinis* izolátum antibiotikumérzékenység vizsgálatát. A vizsgált izolátumokat alacsony koncentrációban gátolta a tiamulin, a tetraciklinek (doxiciklin és oxitetraciklin) és a florfenikol. Míg az enrofloxacin mérsékelt emelkedett koncentrációban volt hatékony. Ezzel szemben a vizsgált makrolidok és linkomicin esetében bimodális MIC eloszlást tapasztaltunk, az izolátumok 42-56%-a mutatott csökkent érzékenységet ezekkel a szerekkel szemben. Kismértékű

eltéréseket tapasztaltunk az országok között a makrolidok és a linkomicin MIC₅₀ értékeiben. Az országok közötti eltéréseket magyarázhatják az antibiotikum használat különbségei, akár a beadás módját (parenterális vagy takamány/víz), akár a használati gyakoriságát tekintve. Egy európai országokat (Belgium, Franciaország, Németország és Svédország) vizsgáló tanulmányban lényeges különbségeket találtak az országonként javasolt dózisok esetében, például Németországban a javasolt dózisok alacsonyabbak voltak mint a többi országban (Postma és mtsai., 2015).

Az elmúlt 35 évben megjelent európai *M. hyorhinis* izolátumokhoz tartozó MIC adatok összehasonlítása alapján változatlan alacsony MIC értékeket találtunk a tiamulin és a tetraciklinek esetében. Ez alapján ezek az antibiotikumok hatékonyan alkalmazhatóak *M. hyorhinis* okozta megbetegedés gyógykezelésére. Azonban a makrolidok és linkomicin esetén tapasztalt bimodális mintázat felhívja a figyelmet a rendszeres antibiotikumérzékenység vizsgálat fontosságára.

Mismatch amplification mutation assay

A makrolid és linkozamid típusú antibiotikumok kémialag különböznek ugyan, de azonos a hatásmechanizmusuk és átfednek a kötőhelyeik is (ugyanez igaz a streptogaminokra, ketolidokra és oxazolidinonokra; Leclercg, 2002). Mindkét antibiotikum család a fehérje szintézist gátolja azzal, hogy reverzibilisen kapcsolódik a riboszóma 50S alegységéhez. A kötőhely módosulását a 23S rRNS gén pontmutációin keresztül több állategészségügyi jelentőségű *Mycoplasma* faj esetében leírták már. Illetve madarakat és kérődzőket fertőző *Mycoplasma* fajok esetén az L4 és L22 riboszóma fehérjékben is találtak ilyen pontmutációt (Gautier-Bouchardon, 2018; Bekő és mtsai., 2020, Gróznér és mtsai., 2022). *M. hyorhina* izolátumokban korábban már leírtak egy, a csökkent makrolidérzékenységgel összefüggő pontmutációt a 23S rRNS gén V doménjében az 2059 pozícióban (A2059G *E. coli* számozás szerint; Kobayashi és mtsai., 2005). Mi a vizsgált izolátumokban ugyanebben a régióban a 2058-as pozícióban (*E. coli* számozás szerint) találtunk egy transzverziót (A2058G) a csökkent makrolid- és linkomicinérzékenységgel összefüggésben.

Erre a pontmutációra egy MAMA tesztet fejlesztettünk, ami egy költséghatékony megoldást kínál a makrolid és linkomicin érzékenység gyors vizsgálatára. A fejlesztett tesztel kapott eredmények megfeleltek az *in vitro* meghatározott MIC értékeknek. Három izolátum esetében tapasztaltunk csak eltérést az eredményekben. Ezekben a 23S rRNS génszekvenciája alátámasztotta a MAMA eredményét. Ezt figyelembe véve más rezisztencia mechanizmusok jelenlétét is feltételezhetjük. Aktív kiválasztó rendszerek, az antibiotikumok inaktiválása (Leclercq, 2002) vagy biofilm képzése is hozzájárulhat a MIC értékek emelkedéséhez (Tassew és mtsai., 2017).

Összefoglalva, a fejlesztett rendszer megbízható iránymutatást ad az antibiotikum kezeléshez abban az esetben, ha a makrolid- és linkomicinérzékenység vizsgálat eredményére rövid időn belül szükség van.

Genotipizáló módszerek

A hatékony genotipizáló eljárások kulcsfontosságúak a *M. hyorhinis* fertőzés terjedésének jobb megértéséhez és járványtani nyomozások lefolytatásához. A korábban leírt hat gén alapú MLST bár nagy felbontóképességgel rendelkezik, alacsony a megismételhetősége (MLSTp;

Tocqueville és mtsai., 2014; Trüeb és mtsai., 2016). A felbontóképesség javítására egy módosított, sejtfelszíni fehérjék génszakaszait tartalmazó MLST rendszert is leírtak (MLSTs; Clavijo és mtsai., 2019). A sejtfelszíni fehérjék génszakaszainak használata azonban csökkent a rendszer megbízhatóságát (Estoup és mtsai., 2002; Urwin és Maiden, 2003). Végül, az itt leírt rendszer elkészülése után, egy core genom MLST rendszert is felállítottak, amivel szintenyészetek a legnagyobb felbontással különíthetők el egymástól (Bünger és mtsai., 2021). A különböző MLST rendszerek mellett egy két lókuszt vizsgáló MLVA-t is leírtak korábban *M. hyorhina* izolátumok jellemzésére (Dos Santos és mtsai., 2015).

Munkánk során nagy felbontóképességű MLST (Simpson diverzitás 0,986) és MLVA (Simpson diverzitás 0,999) rendszereket fejlesztettünk. Általában az egy telepről származó izolátumok azonos, vagy közeli rokon szekvencia típusba sorolódtak mindegyik MLST rendszerben. Ennek oka, hogy korlátozott számú háztartási gén fragment felhasználásával csak korlátozottan különíthetők el a közeli rokon izolátumok (Urwin és Maiden, 2003). Rövid időn belül (hat hónap és egy év között), ugyanarról a telepről származó izolátumok esetében is azonosítottunk azonban nagyon különböző

ST-eket, ez alapján feltételezzük, hogy az eltelt idő alatt új törzsek kerülhettek be az állományba. Az alapján, hogy ugyanaz az izolátum (megegyező MLST és MLVA profilok) található meg egy állat különböző szerveiben, feltételezzük, hogy egy törzs képes a makroszkópos elváltozásokat kiváltani minden érintett szervben.

A nemrég publikált cgMST rendszert összehasonlították az MLSTn és MLSTp rendszerekkel 73 német és osztrák *M. hyorhinae* izolátum alapján (Bünger és mtsai., 2021). Az MLSTn eredményei jobban összeváltak a cgMLST eredményeivel (Rand koefficiens 0,496), mint az MLSTp eredmények (Rand koefficiens 0,179). Ezen felül az MLSTp rendszerrel néhány távoli rokon izolátum egy csoportba került, szemben a cgMLST és az MLSTn eredményekkel (Bünger és mtsai., 2021).

Az MLSTn és az MLVA megbízható, jól reprodukálható és nagy felbontóképességű molekuláris biológiai módszerek *M. hyorhinae* izolátumok jellemzésére. Közel rokon izolátumok kapcsolatainak feltérképezéséhez a kombinált MLST és MLVA módszert javasoljuk. Az MLVA emellett pedig önmagában alkalmas járványtani nyomozások lefolytatására, alapvető laboratóriumi eszközök és technikák segítségével.

Fertőzési modell

Az elérhető irodalmi adatok alapján az egy dózisú *M. hyorhinis* fertőzés sem intranazális, sem intravénás, sem intraperitoneális úton nem alkalmas az összes jellemző elváltozás kiváltására (Lin és mtsai., 2006; Gomes Neto és mtsai., 2014; Lee és mtsai., 2018; Martinson és mtsai., 2018a; Fourour és mtsai., 2019; Wei és mtsai., 2020). Ezért Martinson és munkatársai (2018a) korábbi munkája alapján egy két dózisú, intravénás és egy két dózisú, kevert, intravénás és intraperitoneális fertőzési módot alkalmaztunk a vizsgálatunk során.

A két dózisú IV beadási móddal (melyet korábban még nem alkalmaztak) ugyan olyan fokú érintettséget tapasztaltunk az ízületekben mint az IV-IP fertőzés mellett (legalább egy ízület gyulladását regisztráltuk mindkét csoportban minden állat esetében). Ez meghaladta a korábbi vizsgálatokban ízületgyulladásban érintett egyedek számát (az egy dózisú IV beoltás 1/10 állatban okozott ízületgyulladást; Martinson és mtsai. 2018a). A fertőzési módok kombinálásával (IV-IP csoport) kifejezettebbek lettek az ízületgyulladás klinikai tünetei (duzzanat és sántaság) és hamarabb is jelentkeztek. Másrészt, az IV-IV csoportban több szervet érintett a savóshártyagyulladás, mint az IV-IP csoportban. A

boncolás során tapasztalt elváltozások többsége mindkét csoportban krónikusnak bizonyult. Ízületek esetében ezt jelezték az ízületi membrán megszorodása és az ízületi tok megvastagodása. Míg a savóshártyák krónikus gyulladásának jelei az összenövések és a membránok megvastagodása, ezeket mind a szívburok, mind a mellhártya esetén tapasztaltuk. A kevés re-izolátum a PCR pozitív minták számához képest szintén a fertőzés késői fázisának jele lehet. Ebből kifolyólag a megfigyelési idő rövidítését javasoljuk. Mivel a *M. hyorhinis* fertőzés klinikai tünetei két hét elteltével elkezdnek mérséklődni (Barden és Decker, 1971; Wang és mtsai., 2022a), a megfigyelés hosszát az alapján kell meghatározni, hogy mikor jelennek meg az első klinikai tünetek.

Figyelembe véve a feltételezést, hogy a baktérium terjedésének természetes módja a keringési- vagy a nyirokrendszeren keresztül történik, illetve azt hogy az IV-IV csoportban súlyosabbak voltak a kórbonctani elváltozások, a két dózisú intravénás fertőzést javasoljuk a továbbiakban használni.

Új tudományos eredmények

Ad. 1.: Az elvégzett antibiotikumérzékenységi vizsgálatok nélkülözhetetlen információt szolgáltatnak tíz – a sertés ágazatban gyakran használt – antibiotikum minimális gátló koncentráció értékeiről öt európai országból származó, 76 *M. hyorhinis* izolátummal szemben. Az elért eredmények nemcsak napjainkban, a célzott antibiotikum felhasználás elősegítése érdekében fontosak, hanem jövőbeli eredményekkel összevetve az antibiotikumérzékenység változásának nyomkövetésében is elengedhetetlenek lesznek.

Ad. 2.: A vizsgált *M. hyorhinis* izolátumokban azonosítottunk egy korábban leírt csökkent makrolid- és linkomicinérzékenységgel összefüggő molekuláris markert. Erre a pontmutációra egy gyors és megbízható molekuláris tesztet (MAMA) fejlesztettünk. A kidolgozott módszer elősegítheti a gyors és célzott antibiotikum terápia alkalmazását a fetőzött állományokban.

Ad. 3.: Új, PCR alapú genotipizáló rendszereket (MLST és MLVA) fejlesztettünk, melyek segítségével vizsgálható a fertőzés járványtana és a *M. hyorhinis* izolátumok rokonsági kapcsolatai. A fejlesztett MLST rendszert összehasonlítottuk a korábban leírt MLST rendszerekkel. Vizsgálatainkból kiderült, hogy a mi MLST rendszerünk rendelkezik a legnagyobb felbontóképességgel és mutatja legmegbízhatóbban a *M. hyorhinis* törzsek genom-alapú rokonságát.

Ad. 4.: A fejlesztett MLST és MLVA segítségével 41 *M. hyorhinis* izolátum genotipizálását és filogenetikai vizsgálatát végeztük el. A fejlesztett MLST nagy felbontóképességgel különítette el a vizsgált *M. hyorhinis* izolátumokat. Az MLVA módszerrel kombinálva a közel rokon izolátumok is elkülöníthetőek voltak.

Ad. 5.: Két *M. hyorhinis* fertőzési modellt dolgoztunk ki öt hetes malacokban. Mind a két intravénás dózisú, mind a kevert intravénás és intraperitoneális fertőzéssel sikerült a betegségre jellemző elváltozásokat kiváltani. A fertőzési modell így alkalmas lehet vakcina hatékonysági vizsgálatok elvégzésére.

Tudományos publikációk

Az értekezés témájához kapcsolódó lektorált publikációk:

Földi D., Klein U., Belec N., Hrivnák V., Somogyi Z., Gastaldelli M., Merenda M., Catania S., Dors A., Siesenop U., Vyt P., Kreizinger Zs., Depondt W., Gyuranecz M.: **Antimicrobial susceptibility profiles of *Mycoplasma hyorhinis* strains isolated from five European countries between 2019 and 2021**, Plos One, 17, e0272903, 2022.

Földi D., Kreizinger Zs., Bekő K., Belec N., Bányai K., Kiss K., Biksi I., Gyuranecz M.: **Development of a molecular biological assay for the detection of markers related to decreased susceptibility to macrolides and lincomycin in *Mycoplasma hyorhinis***, Acta Veterinaria Hungarica, 69, 110-115, 2021.

Földi D., Kreizinger Zs., Gyuranecz M.: **Sertések *Mycoplasma hyorhinis* okozta megbetegedése**, Magyar Állatorvosok Lapja, 142, 515-524, 2020.

Földi D., Bekő K., Felde O., Kreizinger Zs., Kovács ÁB., Tóth F., Bányai K., Kiss K., Biksi I., Gyuranecz M.: **Genotyping *Mycoplasma hyorhinis* by multi-locus sequence typing and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis**, Veterinary Microbiology, 249, 108836, 2020.

Egyéb lektorált publikációk:

Klose SM., Olaogun OM., Disint JF., Shil P., Gyuranecz M., Kreizinger Zs., Földi D., Catania S., Bottinelli M., Dall’Ora A., Feberwee A., van der Most M., Andres DM., Underwood GJ., Morrow CJ., Noormohammadi AH., Marends MS.: **Genomic diversity of a globally used, live attenuated *Mycoplasma* vaccine**, Microbiology Spectrum, e02845-22, 2022.

Bekő K., Gróznér D., Mitter A., Udvari L., Földi D., Wehmann E., Kovács ÁB., Bányai K., Gyuris É., Thuma Á., Kreizinger Zs., Gyuranecz M.: **Development and evaluation of temperature-sensitive *Mycoplasma anserisalpingtonis* clones as vaccine candidates**, Avian Pathology, 51, 535-549, 2022.

Buni D., Udvari L., Földi D., Belec N., Yvon C., Bradbury J., Catania S., Lysansky I., Kovács L., Gyuranecz M., Kreizinger Zs.: ***In vitro* susceptibility of *Mycoplasma iowae* isolates to antimicrobial agents**, Avian Pathology, 51, 374-380, 2022.

Földi D., Fodor L., Lőrincz Zs., Makrai L.: **A nátriumhipoklorit sprocid hatása házi méh (*Apis mellifera*) nyúlós költésrothadását okozó *Paenibacillus larvae* spóráira**, Magyar Állatorvosok Lapja, 144, 183-191, 2022.

Hornok S., Boldogh SA., Takács N., Juhász A., Kontschán J., Földi D., Koleszár B., Morandini P., Gyuranecz M., Szekeres S.: **Anaplasmataceae closely related to *Ehrlichia chaffeensis* and *Neorickettsia helminthoeca* from birds in Central Europe, Hungary**, Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 113, 1067-1073, 2020.

Köszönetnyilvánítás

Legelőször szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Kreizinger Zsuzsának és Gyuranecz Miklósnak a segítségükért, támogatásukért és szakmai tanácsaikért.

Hálás vagyok a konzulenseimnek, Wehmann Enikőnek a beszélgetésekért és a sok segítségért; és Makrai Lászlónak a régóta tartó folyamatos támogatásáért.

Szeretnék köszönetet mondani a jelenlegi és korábbi kollégáimnak Bekő Katinkának, Gróznér Dénesnek, Kovács Áronnak, Buni Dominikának, Költő Karolának, Hrivnák Veronikának, Felde Orsolyának, Mitter Alexának és Udvari Lillának a Zoonotikus bakteriológia és mycoplasmatológia témacsoportban. Külön köszönet jár a “sertés csapatnak”, Nagy Eszter Zsófiának, Belecz Nikolettnek és Tóth Lillának részvételükért a munkában és a mindennapi jókedvéért.

Köszönöm Bányai Krisztián és csoportja segítségét a teljes genom szekvenálásban. Köszönöm minden közreműködő segítségét, különösen Kiss Krisztián, Biksi Imre, Ulrich Klein, Salvatore Catania, Arkadiusz Dors, Ute Siesenop, Philip Vyt és munkatársaik hozzájárulását a

törzsgyűjtemény bővítéséhez és az európai izolátumok biztosításához.

Szeretném megköszönni Szeredi Levente, Kollár Anna és Tenk Miklós munkáját a fertőzési modell létrehozásában. Külön köszönöm édesapámnak, Földi Józsefnek a folyamatos támogatását, és mellette nagyon fontos hozzájárulását a sertés kísérletek kivitelezésében.

Végül szeretném megköszönni a családomnak és a barátaimnak, hogy végig kitartottak, és támogattak az elmúlt években.

A munka a Magyar Tudományos Akadémia Lendület programjának (LP2012-22 és LP2022-6/2022), a Huvepharma® NV és a Széchényi Terv Plusz Nemzeti Laboratóriumok létrehozása, complex fejlesztése pályázatának (RRF-2.3.1-21-2022.00001) hozzájárulásával készült. Továbbá a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal Új Nemzeti Kiválóság programja (ÚNKP-20-3-I-ÁTE-4 és ÚNKP-21-3) és Kooperatív Doktori programja (KDP-2020) támogatták.