

Állatorvostudományi Egyetem
Aujeszky Aladár Elméleti Állatorvostudományok
Doktori Iskola

***Mycoplasma hyopneumoniae* izolátumok genetikai
változatossága és antibiotikum érzékenysége**

Ph.D. értekezés tézisei

Stammné Felde Orsolya

2019

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. Bányai Krisztián, Ph.D.
Magyar Tudományos Akadémia
Agrártudományi Kutatóközpont
Állatorvos-tudományi Intézet
témabizottság tagja

Bevezetés

A Mollicutes osztályba tartozó *Mycoplasma hyopneumoniae* egy világszerte elterjedt baktérium, mely súlyos gazdasági károkat okozhat a sertés ágazatban a mycoplasma pneumonia vagy a sertések légzőszervi betegség komplexének (PRDC) előidézése révén. A kórokozó terjedésének legfőbb módja az állatok közvetlen érintkezése mellett a baktérium levegő útján való terjedése (Artiushin és Minion, 1996; Maes és mtsai., 1996, 2008). A járványtani nyomozások során a genotipizáló vizsgálatok segíthetnek feltárni a fertőzés terjedésének útvonalát és ezzel hozzájárulhatnak a további fertőzések visszaszorításához.

A megelőzés és mentesítés legfontosabb lehetőségei a vakcinás védekezés és az antibiotikus gyógykezelés (Maes és mtsai., 1996). A kereskedelmi forgalomban kapható, többnyire bakterin típusú vakcinák sikeresen enyhítik a klinikai tüneteket, azonban nem nyújtanak tökéletes védelmet a baktérium megtelepedésével szemben (Meyns és mtsai., 2006).

Habár a legtöbb antibiotikum sikeresen alkalmazható *M. hyopneumoniae* fertőzés kezelésére, a baktérium természetes rezisztenciája miatt egyes csoportok, mint a sejtfalszintézis gátlók vagy a szulfonamidok, hatástalanok vele szemben (Taylor-Robinson és Bébéar, 1997). Szakirodalmi adatok szerint szerzett rezisztencia is előfordulhat fluorokinolon, makrolid és linkóزامid típusú antibiotikumokkal szemben (Gautier-Bouchardon, 2018). A megfelelő antibiotikum választáshoz elengedhetetlen az állományokban található törzsek antibiotikum érzékenységi vizsgálata, amely *M. hyopneumoniae* esetében mikroleves hígítási módszerrel történik (Hannan, 2000). Ez azonban a körülményes és időigényes tenyésztés miatt nem része a rutin diagnosztikának. Helyette a hatóanyag kiválasztása többnyire tapasztalati úton történik, azonban a nem megfelelő antibiotikum használat elősegítheti a rezisztencia kialakulását.

A fluorokinolon típusú antibiotikumok a DNS giráz és a topoizomeráz IV enzimekhez kötődve fejtik ki a hatásukat. Szakirodalmi adatok szerint az ezeket az enzimeket kódoló *gyrA* és *parC* génekben bekövetkező bizonyos pontmutációk összefüggést mutatnak a *M. hyopneumoniae* törzsek csökkent antibiotikum érzékenységgel (Le Carrou és mtsai., 2006; Vicca és mtsai., 2007). A makrolid és linkóزامid típusú antibiotikumok a bakteriális riboszóma 50S alegységéhez kötődve fejtik ki hatásukat. A 23S rRNS szekvenciában bekövetkező mutációk korrelációt mutatnak a baktérium csökkent antibiotikum érzékenységgel (Gautier-Bouchardon, 2018). A rezisztencia markerek vizsgálatán alapuló molekuláris biológiai rendszerek elősegíthetik a csökkent antibiotikum érzékenységgel összefüggést mutató genotípusok gyors és költséghatékony kimutatását.

Célkitűzések

Az értekezés célkitűzései:

- Ad 1.** egy hazai *M. hyopneumoniae* törzsgyűjtemény felállítása, mely a későbbi vizsgálatok alapjául szolgál;
- Ad 2.** a hazai *M. hyopneumoniae* izolátumok összehasonlító genetikai vizsgálata multi-locus sequence typing (MLST) és multi-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) rendszerekkel illetve a *p146* gén szekvencia elemzésével, valamint a felhasznált molekuláris rendszerek összehasonlítása;
- Ad 3.** a *M. hyopneumoniae* törzsgyűjtemény tagjainak *in vitro* antibiotikum érzékenységi vizsgálata 15 antibiotikummal szemben;
- Ad 4.** az *in vitro* tesztek során tapasztalt csökkent fluorokinolon, makrolid és linkóزامid érzékenység genetikai hátterének megismerése;
- Ad 5.** gyors és költséghatékony PCR-alapú kimutatási rendszerek fejlesztése *M. hyopneumoniae* fluorokinolon, makrolid és linkóزامid érzékenységének vizsgálatára.

Anyag és módszer

***M. hyopneumoniae* izolátumok**

Vizsgálatainkba a *M. hyopneumoniae* típus törzset (J törzs, NCTC 10110) valamint a 44 tagot számláló törzsgyűjteményünk tagjait vontuk be. A törzseket magyarországi vágóhidakon gyűjtött, jellegzetes makroszkópos elváltozást mutató sertés tüdő mintákból izoláltuk 2015 és 2016 között. A tenyésztéshez Friis táplevest használtunk, melyet 4-6 hétig inkubáltunk (37°C, 5% CO₂). A *M. hyopneumoniae* jelenlétéről a levestenyészetben a 16S rRNS szekvenciát vizsgáló fajspecifikus PCR segítségével győződünk meg (Mattsson és mtsai., 1995). Az egyéb, kontamináns mycoplasmák jelenlétét a 16S/23S rRNS intergénikus régiót vizsgáló univerzális mycoplasma PCR használatával zártuk ki (Lauermann és mtsai., 1995).

Genotipizálás

Az izolátumok filogenetikai kapcsolatainak feltárásához három (*adk*, *rpoB* és *tpiA*) és hét (*efp*, *metG*, *pgiB*, *recA*, *adk*, *rpoB* és *tpiA*) háztartási gén szekvencia-elemzésén alapuló multi-locus sequence typing (MLST) rendszereket alkalmaztunk (Mayor és mtsai., 2008). A rokonsági viszonyok további felbontására négy tandemismétlődő régió (Locus-1, -2 és P97-RR1, -RR2), illetve ezek kombinációinak vizsgálatával MLVA elemzést végeztünk (Vranckx és mtsai., 2011; Charlebois és mtsai., 2014). A genotipizáló rendszerek egyes kombinációit kiegészítettük a szerin ismétlődésekben gazdag *p146* gén szekvenciaelemzésével (Mayor és mtsai., 2007).

A genotipizáló rendszerek felbontó képességének meghatározására a Simpson-féle diverzitás indexet használtuk (Hunter és Gaston, 1988). Az egyes módszerek kongruenciáját és felcserélhetőségét az izolátumok adatainak elemzéséből számított illesztett Rand és Wallace koefficiensek segítségével adtuk meg (Carriço és mtsai., 2006; Severiano és mtsai., 2011).

Antibiotikum érzékenységi vizsgálat

Felmértük 44 hazai *M. hyopneumoniae* izolátum és a típus törzs (J törzs) antibiotikum érzékenységi profilját mikrolevességs hígítási módszerrel (Hannan, 2000), nyolc antibiotikum csoport 15 tagjával szemben (fluorokinolonok (enrofloxacin, marbofloxacin); tetraciklinek (oxitetraciklin, doxiciklin); aminociklitol (spektinomycin); aminoglikozid (gentamicin); makrolidok (tilozin, tilvalozin, tilmikozin, tulatromicin, gamitromicin); linkóزامid (linkomicin); pleuromutilinek (valnemulin, tiamulin) és fenikol (florfenikol).

A minimális gátló koncentrációk (MIC) kezdeti értékét a növekedési kontroll színváltozásakor (4-14 nap elteltével) jegyeztük fel, míg a végső MIC értékeket akkor olvastuk le, amikor további színváltozást már nem tapasztaltunk. A kapott értékeket hivatalos értékhatár hiányában a korábbi publikációkban leírt eredményekkel vetettük össze.

Antibiotikum rezisztenciáért felelős mutációk azonosítása

Az *in vitro* antibiotikum érzékenységi vizsgálatok során leírt csökkent antibiotikum érzékenység genetikai hátterének feltárásához meghatároztuk a törzsgyűjtemény tagjainak teljes genom szekvenciáit IonTorrent platform segítségével (Rónai és mtsai., 2015). Szakirodalmi adatok alapján, a csökkent fluorokinolon (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*), makrolid és linkóزامid (23S rRNS) érzékenységgel összefüggést mutató géneket vizsgáltuk, mely során összevetettük az alacsony illetve emelkedett MIC értékeket mutató törzsek szekvenciáit (Le Carrou és mtsai., 2006; Vicca és mtsai., 2007; Gautier-Bouchardon, 2018). Az elemzés során azonosított, aminosav cserével járó pontmutációk jelenlétét Sanger-féle szekvenálási módszerrel ellenőriztük.

Molekuláris biológiai tesztek fejlesztése

A fluorokinolonokkal, makrolidokkal és linkóزامidokkal szembeni magas MIC értékekért felelős pontmutációk kimutatására mismatch amplification mutation assay (MAMA) és high resolution melt (HRM) rendszereket fejlesztettünk. A kidolgozott molekuláris biológiai rendszerek eltérő méretű, versengő primerek segítségével, illetve a termékek különböző olvadási hőmérsékletének (melting temperature, T_m) érzékelése alapján képesek akár egy nukleotid eltérést is kimutatni a keletkező PCR termékekben. A tesztek megbízhatóságát a törzsgyűjtemény ismert antibiotikum érzékenységu tagjain ellenőriztük, és meghatároztuk a tesztek érzékenységét valamint vizsgáltuk keresztreakció előfordulásának lehetőségét más, sertésekben fellelhető *Mycoplasma* fajok esetén.

Eredmények

Genotipizálás

A vizsgált *M. hyopneumoniae* izolátumok nagy változatosságát tártuk fel az összes alkalmazott molekuláris biológiai rendszer segítségével. Az azonos állományból származó törzsek többnyire azonos csoportokba helyezkedtek el, azonban találtunk kivételeket, amikor az azonos mintavételből származó izolátumok a törzsfá különböző ágaira kerültek. A három illetve hét gén vizsgálatán alapuló MLST rendszerek kongruensnek bizonyultak. Az MLST rendszerek Simpson-féle diverzitás indexe megegyezett (0,907), mindkét elemzés 27 különböző szekvencia típusra bontotta a törzsgyűjtemény tagjait. Az MLST vizsgálat felbontási képességét növelte (Simpson index: 0,977) a *p146* gén szekvenciájának bevonása, mely 33 típus elkülönítésére volt alkalmas. Az MLVA és MLST rendszerek valamint a *p146* gén szekvencia elemzése kevéssé mutatott egyezést, azonban az egyes változatok és kiegészítések már kongruensek voltak az adott tipizáló rendszerekben belül. Az MLVA rendszerek közül a legnagyobb felbontási képességet (Simpson index: 0,992) a *p146* gén szerin ismétlődéseinek vizsgálatával kiegészített változatok mutatták (mind a két allél alapú, mind a négy allél alapú MLVA rendszer esetében), melyek 40 különböző genotípusra bontották a vizsgált *M. hyopneumoniae* törzseket. Ez utóbbi rendszer bizonyult a legalkalmasabbnak a többi vizsgálati módszer helyettesítésére.

Antibiotikum érzékenységi vizsgálat

Az eredmények kiértékelése során a kezdeti MIC értékeket vettük figyelembe, és ezek alapján minden antibiotikum hatékonynak bizonyult a vizsgált *M. hyopneumoniae* izolátumok többségével szemben. A fluorokinolonok vizsgálata során azonban egy törzsszel szemben kifejezetten magas antibiotikum koncentrációkra volt szükség a növekedésgátláshoz (2,5-5 µg/ml), valamint több törzs vizsgálata is emelkedett végső MIC értékeket tárt fel (1,25-10 µg/ml). A törzsek 50%-nak illetve 90%-nak növekedését gátló MIC értékek között is jelentős különbséget tapasztaltunk ($\leq 0,039$ µg/ml és 1,25-2,5 µg/ml). Az összes törzsszel szemben alacsony MIC értékeket mutattak a tetraciklinek ($\leq 0,039$ -4 µg/ml), aminoglikozidok és aminociklitolok ($\leq 0,25$ -4 µg/ml), pleuromutilinek ($\leq 0,039$ -0,156 µg/ml) és a fenikolok ($\leq 0,125$ -2 µg/ml). A törzsek zömével szemben szintén alacsony koncentrációban már hatékonynak bizonyultak a makrolidok ($\leq 0,25$ -8 µg/ml) és a linkomicin ($\leq 0,25$ -0,5 µg/ml), azonban egy törzs esetében csökkent makrolid és linkozamid érzékenységet (2->64 µg/ml) írtunk le.

Antibiotikum rezisztenciáért felelős mutációk azonosítása

A csökkent fluorokinolon érzékenység genetikai hátterének feltárása során aminosavcserét figyeltünk meg a *gyrA* (Gly81Ala, Ala83Val, Glu87Gly) és a *parC* (Ser80Phe, Ser80Tyr, Asp84Asn) géneken, azonban nem találtunk aminosav cseréjével járó mutációkat a *gyrB* és *parE* géneken. Vizsgálataink alapján a *parC* génen bekövetkező aminosavcsere önmagában nem jár a kezdeti MIC értékek jelentős változásával (egyetlen mutációt tartalmazó izolátumok kezdeti MIC értékeinek tartománya: $\leq 0,039-0,625$ $\mu\text{g/ml}$), azonban a végső MIC értékek emelkedését okozhatja ($0,312-2,5$ $\mu\text{g/ml}$). A vizsgált pontmutációk egyidejű jelenléte a *gyrA* és *parC* géneken a kezdeti és végső MIC értékek jelentős növekedését okozza (kezdeti MIC: $0,625-5$ $\mu\text{g/ml}$; végső MIC: $1,25-10$ $\mu\text{g/ml}$). Vizsgálataink során a csökkent makrolid és linkozamid érzékenységet mutató izolátum 23S rRNS szekvenciájában az A2059G nukleotidcserét írtuk le, amely összefüggést mutat a kezdeti (makrolid: $2->64$ $\mu\text{g/ml}$, linkozamid: >64 $\mu\text{g/ml}$) és végső (makrolid: $8->64$ $\mu\text{g/ml}$, linkozamid: >64 $\mu\text{g/ml}$) MIC értékek jelentős növekedésével.

Molekuláris biológiai tesztek fejlesztése

Az általunk fejlesztett MAMA és HRM rendszerek sikeresen elkülönítik az érzékeny (alacsony MIC értékeket mutató törzsek) és rezisztens (emelkedett MIC értékeket mutató törzsek) genotípusba tartozó *M. hyopneumoniae* törzseket. A fluorokinolonokkal szembeni érzékenységgel összefüggő, *parC* génen található pontmutációkra (C239T/A és G250A *E. coli* számozás szerint) két MAMA, illetve az egész „hot spot” régióra egy HRM rendszert terveztünk. A C239T/A nukleotid cserét célzó melt- és agaróz-MAMA rendszerek érzékenysége 10^4 kópia a mutációt tartalmazó, és 10^3 kópia az érzékeny genotípus esetén. A G250A nukleotid cserét célzó melt- és agaróz-MAMA rendszerek érzékenysége 10^2-10^3 a rezisztens illetve 10^3 az érzékeny genotípus esetén. *M. flocculare* jelenlétében aspecifikus (az érzékeny és rezisztens genotípusokhoz tartozó olvadási hőmérséklettől eltérő olvadási görbéjű) termék képződését figyeltük meg a G250A nukleotidcseréjének vizsgálata során. A HRM vizsgálat során megkülönböztethető az érzékeny és kétféle rezisztens genotípus. A rendszer érzékenysége 10^5 kópia a szenzitív és 10^{5-6} a rezisztens genotípusok vizsgálata esetén. MAMA rendszereket fejlesztettünk a 23S rRNS szekvencia A2059G nukleotidcseréjének kimutatására, mely összefügg a makrolid és linkozamid érzékenység csökkenésével. Az agaróz-MAMA vizsgálat 10^3 érzékenységgel képes elkülöníteni a szenzitív és 10^2-10^3 érzékenységgel a rezisztens genotípusokat, míg a melt-MAMA rendszerek mindkét genotípust 10^4 érzékenységgel különítik el. Keresztreakció figyelhető meg *M. hyorhinis* és *M. flocculare* jelenlétében.

Megbeszélés

Genotipizálás

A hazai *M. hyopneumoniae* törzsek rokonsági kapcsolatairól eddig nem rendelkezünk adatokkal. Elvégeztük a törzsgyűjtemény tagjainak genotipizáló vizsgálatát különböző MLST és MLVA rendszerekkel illetve az egyes vizsgálatokat kiegészítettük a *p146* gén vizsgálatával, valamint összehasonlítottuk az egyes genotipizáló eljárásokat. Minden genotipizáló rendszer a törzsek nagy heterogenitását tárta fel, ami megfelel a korábbi megfigyeléseknek (de Castro és mtsai., 2006; Calus és mtsai., 2007). Eredményeink alátámasztják a korábbi megfigyelést, miszerint az *adk*, *rpoB* és *tpiA* gének felhasználásával végzett MLST vizsgálat felbontási képessége megegyezik a hét gén alapú MLST vizsgálat felbontó képességével (Mayor és mtsai., 2008; Kuhnert és mtsai., 2011), illetve megállapítottuk, hogy a módszer megfelelő lehet filogenetikai kutatásokhoz. Az izolátumok MLST vizsgálatának kiegészítése a *p146* gén szekvenciájának elemzésével, a korábbi tapasztalatokhoz hasonlóan tovább növelte a rendszer felbontó képességét (Overesch és Kuhnert, 2017). A vizsgált genotipizáló eljárások közül a legnagyobb felbontással a *p146* gén szerin ismétlődéseinek vizsgálatával kiegészített MLVA elemzés rendelkezett, amely sikeresen elkülönítette a közös MLST szekvencia típusba sorolt, de különböző állományokból származó izolátumokat. Az MLVA vizsgálatok így gyors és költséghatékony eljárást biztosítanak járványtani nyomozások során (Charlebois és mtsai., 2014).

Antibiotikum érzékenységi vizsgálat

A sertésállományokban cirkuláló *M. hyopneumoniae* törzsek antibiotikum érzékenységi vizsgálata nem rutin diagnosztikai módszer, mert a baktérium tenyésztése igen körülményes és időigényes (Hannan, 2000). Az eredmények tárgyalását nehezíti a hivatalos határértékek hiánya, melyek csak néhány, embereket fertőző *Mycoplasma* faj esetében ismertek jelenleg (Wayne, 2011).

Habár az összes antibiotikum hatékonynak bizonyult a törzsgyűjtemény tagjaival szemben, csökkent érzékenységet figyeltünk meg fluorokinolonok esetén. Hasonló eredményekről számoltak be Thaiföld és Belgium területéről származó *M. hyopneumoniae* törzsek vizsgálata során is (Vicca és mtsai., 2004; Thongkamkoon és mtsai., 2013). A fluorokinolonok csökkenő érzékenysége komoly probléma, mert ezek az antibiotikumok a humán terápia számára is kiemelten fontosak (Collignon és mtsai., 2009).

Kiemelkedően magas MIC értékeket tapasztaltunk a makrolidok és linkóزامidok vizsgálata során, melyek a sertéságazatban leggyakrabban használt antibiotikumok közé tartoznak (Maes és mtsai., 2008). A makrolidok és a linkóزامidok kémiaailag távol állnak egymástól, mégis gyakran keresztrezisztencia alakul ki, melynek oka, hogy azonos hatásmechanizmussal gátolják a baktériumok metabolizmusát (Weisblum, 1995). A hazai törzsek között talált kifejezetten magas makrolid és linkomicin MIC értékű izolátumhoz hasonló, rezisztens törzsek jelenlétéről Európa és Ázsia más országaiból is beszámoltak már (Vicca és mtsai., 2004; Thongkamkoon és mtsai., 2013; Tavío és mtsai., 2014). Az emelkedett MIC értékek felhívják a figyelmet a rendszeres érzékenységi vizsgálatok fontosságára, ami hozzájárulhat a célzott antibiotikumos kezeléshez, és így a rezisztencia kialakulásának mérsékléséhez.

Antibiotikum rezisztenciáért felelős mutációk azonosítása

A mycoplasma pneumoniae kezelésére leggyakrabban használt antimikrobiális szerek Magyarországon a fluorokinolonok, a makrolidok és a linkóزامidok (EMA, 2015). Ezek használata jelentősen csökkenti a *M. hyopneumoniae* fertőzés következtében kialakuló tünetek súlyosságát, azonban nem megfelelő alkalmazásuk elősegítheti a rezisztens törzsek megjelenését (Maes és mtsai., 1996, 2008). A fluorokinolon típusú antibiotikumok a DNS giráz (*gyrA*, *gyrB*) és a topoizomeráz IV (*parC*, *parE*) enzimek gátlásával fejtik ki a hatásukat. Vizsgálataink során nem mutattunk ki a csökkent fluorokinolon érzékenységgel összefüggést mutató aminosavcserét a *gyrB* és *parE* génekben (Vicca és mtsai., 2007). Habár a *parC* génben található aminosavcsere korábbi megfigyelésekhez hasonlóan összefüggést mutat a csökkent fluorokinolon érzékenységgel, az érzékenység csökkenése sokkal kifejezettebb, ha egyidejűleg a *gyrA* génben is bekövetkezik aminosavcsere (Le Carrou és mtsai., 2006; Vicca és mtsai., 2007; Gautier-Bouchardon, 2018). A makrolid és linkóزامid típusú antibiotikumok a 23S rRNS szekvenciájához kötve fejtik ki gátló hatásukat. Csökkent érzékenység esetén a 2057-2059 régió tagjainak nukleotidcseréjét figyelték meg különböző *Mycoplasma* fajok esetén (Kobayashi és mtsai., 2005; Stakenborg és mtsai., 2005; Sulyok és mtsai., 2017; Gautier-Bouchardon, 2018). Ezzel összhangban vizsgálataink során leírtuk a 23S rRNS szekvencia A2059G cseréjének *M. hyopneumoniae* törzsek antibiotikum érzékenységére gyakorolt hatását.

Molekuláris biológiai tesztek fejlesztése

A fluorokinolonokkal, makrolidokkal és linkózamidokkal szembeni magas MIC értékekért felelős mutációk kimutatására MAMA és HRM rendszereket fejlesztettünk ki, melyek kiegészíthetik az időigényes és körülményes, tenyésztés alapú antibiotikum érzékenységi vizsgálatot (Hannan, 2000). A MAMA és HRM tesztek által vizsgált régiók átfednek, így növelve a módszerek megbízhatóságát. Az agaróz-MAMA rendszerek a legtöbb laboratórium számára elérhető lehetőséget nyújtanak a PCR-alapú antibiotikum érzékenységi vizsgálathoz, míg a HRM vizsgálat ugyan speciális laborfelszereltséget igényel, de egyidejűleg több pozíció vizsgálatára is alkalmas. Az általunk fejlesztett rendszerek lehetővé teszik a különböző antibiotikum-érzékenységgel rendelkező *M. hyopneumoniae* törzsek gyors és költséghatékony elkülönítését fluorokinolonok, makrolidok és linkózamidok esetén, hozzájárulva a célzott antibiotikumos gyógykezeléshez.

Új tudományos eredmények

- Ad 1.** Elvégeztük a hazai *M. hyopneumoniae* izolátumok összehasonlító genetikai vizsgálatát. A *p146* gén felhasználásával kiegészített MLVA elemzés képes tovább bontani az MLST vizsgálat szekvencia típusait, ezáltal megfelelő lehet járványtani nyomozások és filogenetikai vizsgálatok során.
- Ad 2.** Elsőként határoztuk meg a hazai *M. hyopneumoniae* izolátumok antibiotikum érzékenységi profilját 15 antibiotikummal szemben. Habár az összes vizsgált antibiotikum hatékonyan gátolta a vizsgált *M. hyopneumoniae* törzsek többségét, csökkent fluorokinolon-, makrolid- és linkóزامid-érzékenységet mutató izolátumokat is találtunk.
- Ad 3.** A csökkent fluorokinolon érzékenységgel összefüggést mutató mutációkat jegyeztünk fel a *parC* és *gyrA* génekben, míg a csökkent makrolid és linkóزامid érzékenységu *M. hyopneumoniae* izolátumban a rezisztenciával korreláló nukleotidcserét figyeltünk meg a 23S rRNS szekvenciában.
- Ad 4.** MAMA és HRM rendszereket terveztünk a *M. hyopneumoniae*-ban előforduló, a csökkent antibiotikum érzékenységgel összefüggést mutató mutációk gyors és költséghatékony PCR-alapú kimutatására.

Publikációs lista

A kutatás témájával kapcsolatban, lektorált tudományos folyóiratokban megjelent közlemények

1. **Felde O.**, Kreizinger Z., Sulyok K. M., Hrivnák V., Kiss K., Jerzsele Á., Biksi I., Gyuranecz M.: **Antibiotic susceptibility testing of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates from Central Europe for fifteen antibiotics by microbroth dilution method**, Plos ONE 13:12p e0209030, 2018
2. **Felde O.**, Kreizinger Z., Sulyok K.M., Marton S., Bányai K., Korbuly K., Kiss K., Biksi I., Gyuranecz M.: **Genotyping *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates based on multi-locus sequence typing, multi-locus variable number tandem repeat analysis and analysing gene p146** Vet. Mic. 222. 85-90, 2018.
3. **Felde O.**, Kiss K., Biksi I., Jerzsele Á., Gyuranecz M.: **A sertések *Mycoplasma hyopneumoniae* okozta tüdőgyulladásáa**, Magy Állatorvosok Lapja 140. 337-348, 2018.

Egyéb, lektorált folyóiratokban megjelent tudományos közlemények

1. 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. Mic. 228. 196-201, 2019.
2. Marosi A., Dufkova L., Forró B., **Felde O.**, Erdélyi K., Sirmarova J., Palus M., Honig V., Salat J., Tikos R., Gyuranecz M., Ruzek D., Martina B., Koraka P., Osterhaus A.D.M.E., Bakonyi T.: **Combination therapy of rabies-infected mice with inhibitors of pro-inflammatory host response, antiviral compounds and human rabies immunoglobulin**. Vaccine 37. 4724-4735, 2019.
3. Kreizinger Z., Sulyok K.M., Bekő K., Kovács Á.B., Gróznér D., **Felde O.**, Marton S., Bányai K., Salvatore C., Dusan B., Gyuranecz M.: **Genotyping *Mycoplasma synoviae*: Development of a multi-locus variable number of tandem-repeats analysis and comparison with current molecular typing methods**. Vet. Mic. 226. 41-49, 2018
4. Kreizinger Z., Erdélyi K., **Felde O.**, Fabbi M., Sulyok K.M., Magyar T., Gyuranecz M.: **Comparison of virulence of *Francisella tularensis* ssp. *holartica* genotypes B.12 and B.FTNN002-00** BMC Vet. Res. 13. 46. 2017.

5. Wernery U., Gyuranecz M., Kinne J., Raghavan R., Syriac G., Johanson B., Kreizinger Z., Dénes B., **Felde O.**, Magyar T., Jose Sh., Raja S., John J., Wernery R.: **Laboratory investigations after eye drop immunisation of dromedaries with live attenuated *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine**, J. Camel Pract. Res. 24. 9-14, 2017.
6. Gyuranecz M., Wernery U., Kreizinger Z., Juhász J., **Felde O.**, Nagy P.: **Genotyping of *Brucella melitensis* strains from dromedary camels (*Camelus dromedarius*) from the United Arab Emirates with multiple-locus variable-number tandem repeat analysis** Vet. Mic. 186. 8-12, 2016.
7. Kreizinger Z., Sulyok K.M., Pásztor A., Erdély 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 the wild-type *Mycoplasma synoviae* isolates**. Plos One 10. e0133554. 8, 2015.
8. Kiss O., **Felde O.**, Moskát C.: **A mozaikgyepek szerepe a szalakóta (*Coracias garrulus*) táplálkozó területeinek megőrzésében**. Természetvédelmi Közlemények. 18 pp. 276-282, 2012

Köszönetnyilvánítás

Először is szeretnék köszönetet nyilvánítani a témavezetőmnek, Gyuranecz Miklósnak a lehetőségért, hogy tagja lehetek a Zoonótikus Bakteriológia és Mycoplasmatológia Témacsoportnak. Szeretném kifejezni felé hálámat, amiért az évek során türelemmel irányított.

Kimondhatatlanul hálás vagyok Kreizinger Zsuzsának is, aki annyi időt és energiát szánt a fejlődésemmre, mind a laboratóriumi munkák során mind pedig a publikálások során.

Hálával tartozom a témabizottsági tagoknak, Dán Ádámnak és Bányai Krisztiánnak, amiért tanácsaikkal növelték a munkám értékét. Bányai Krisztiánnak és Marton Szilviának külön köszönet jár, amiért segítettek a teljes genom szekvenálás folyamatában.

Biksi Imrének és Kiss Krisztiánnak szeretném megköszönni a *M. hyopneumoniae* törzsgyűjtemény elkészítésében nyújtott segítségüket. Továbbá hálás vagyok mindazoknak, akik a vágóhídi munkám során mellettem voltak.

Szeretnék köszönetet mondani régi és jelenlegi kollégáimnak, Görföl-Sulyok Kingának, Hrivnák Veronikának, Gróznér Dénesnek, Bekő Katinkának, Földi Dorottyanak és Kovács Áronnak a mindennapok során nyújtott segítségükért, és folyamatos jókedvükért.

Mindenekfelett pedig szeretném kifejezni a hálámat a férjem és a családom irányába, azok felé, akik mindvégig mellettem álltak és ezzel a legnehezebb időket is elviselhetővé tették.

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