

MTA ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI BIZOTTSÁGA  
ÁTE ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

**AKADÉMIAI BESZÁMOLÓK**  
(2020. JANUÁR 20-23.)

**BAKTERIOLÓGIA**  
**MIKOLÓGIA**  
**VIROLÓGIA**  
**IMMUNOLÓGIA**

2019. évi 46. füzet

## ELŐSZÓ

### **Kedves Kolleganók és Kollegák!**

Az MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága és az Állatorvostudományi Egyetem Állatorvostudományi Doktori Iskolája 2020. január 20-23. között tartja a legújabb kutatási eredményeink bemutatására szolgáló **Akadémiai Beszámolók** ülésorozatot, amelyre idén 46. alkalommal kerül sor az Állatorvostudományi Egyetemen.

Az előző évek gyakorlatának megfelelően a beszámolókon PhD-hallgatók és a kiemelkedő munkát végző TDK-hallgatók szereplését külön is szorgalmazzuk, és reméljük, hogy a rendezvény jó alkalmat nyújt a különböző tudományos-szakmai műhelyeket és korosztályokat képviselő, egymás munkája iránt érdeklődő szakemberek találkozására.

Az előadások összefoglalóit – szekciófüzetekbe csoportosítva – elektronikus úton adjuk közre. A beszámoló füzetek anyaga az MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézet honlapján ([http://aoti.agrar.mta.hu/mta\\_beszamolok](http://aoti.agrar.mta.hu/mta_beszamolok)) megtalálható.

Az előadások és azt követő megvitatás időtartama legfeljebb 10 + 5 perc. Kérjük, hogy a megadott időtartamot senki ne lépje túl. Az előző évek gyakorlatának megfelelően, nem az előadások számára, hanem azok szakmai-tudományos értékére helyezzük a súlyt. Aki azonos témán belül jelentett be 2 vagy több előadást, kérjük, próbálja meg ezeket összevonni.

A résztvevőket, különösen a bizottsági tagokat és az üléelnököket arra kérjük, hogy kérdéseikkel, megjegyzéseikkel, javaslataikkal, segítsék az előadottak részletesebb megismerését, értékelését és a beszámoló szakmai műhelyek további munkáját. A tudományos előrehaladást a fiatalok tudományos fórumokhoz való szoktatását a vita éppúgy szolgálja, mint maga az előadás.

Az egyes szekciók titkárait arra is kérjük, hogy a szekcióülésről február végéig készítsenek és juttassanak el az Állatorvos-tudományi Bizottság titkárához ([magyar.tibor@agrar.mta.hu](mailto:magyar.tibor@agrar.mta.hu)) egy-egy rövid, közérthető formában megírt, a szekció elnökökkel egyeztetett tájékoztatót (a Magyar Állatorvosok Lapjában való közlés céljából), amely tartalmazza nem csak az előadások, hanem a vita legfontosabb megállapításait is.

Kérjük az intézetek vezetőit, hogy az elektronikus úton megküldött anyagot továbbítsák munkatársaik és érdeklődő nyugdíjasaik számára is. Kérjük, továbbá, hogy tegyék lehetővé munkatársaik részvételét az üléseken.

Előre is köszönjük a szekció elnökök, a titkárok, a bizottsági tagok és valamennyi előadó munkáját.

Kívánunk mindenkinek eredményes és hasznos tanácskozást.

Gálfi Péter  
MTA ÁTB elnöke

Sótonyi Péter  
Rektor, TDK elnök

Vörös Károly  
ÁODI elnöke

Magyar Tibor  
MTA ÁTB titkára

**MTA Állatorvos-tudományi Bizottság és az ÁTE Állatorvostudományi DI akadémiai beszámolóinak programja és szekcióbizottságai**  
(2020. január 20-23.)

<b>A szekció megnevezése</b>	<b>A szekcióülés ideje</b>	<b>A szekcióülés helye</b>	<b>Társelnökök</b>	<b>Titkár</b>	<b>Bizottsági tagok</b>
Élettan és biokémia Patológia Gyógyszertan és toxikológia Morfológia	I. 20. hétfő 8:30-	Tormay Béla előadóterem	Bartha Tibor Jerzsele Ákos Neogrády Zsuzsanna Sótonyi Péter	Farkas Orsolya Mátis Gábor	Csikó György Halasy Katalin Kutas Ferenc Rác Bence Zsarnovszky Attila
Élelmiszer-higiéncia Állategészségügyi Igazgatás	I. 20. hétfő 8:30-	Marek József előadóterem	Laczay Péter Ózsvári László	Darnay Livia	Józwiak Ákos Kovács Sándor Lehel József, Szita Géza
Bakteriológia	I. 21. kedd 8:30-	Tormay Béla előadóterem	Fodor László Magyar Tibor	Kreizinger Zsuzsa	Hajtós István, Bernáth Sándor Gyuranecz Miklós Makrai László, Tenk Miklós, Tóth István
Viroológia Immunológia	I. 21. kedd 14:30-		Harrach Balázs Hornyák Ákos	Kaján Győző	Benkő Mária, Dán Ádám Pénzes Zoltán, Rusvai Miklós Soós Tibor, Zádori Zoltán
Állathigiéncia Állattenyésztés Genetika Takarmányozástan	I. 22. szerda 14:00-	Tormay Béla előadóterem	Könyves László Szabó József	Bersényi András	Brydl Endre, Cseh Sándor Fekete Sándor, Gáspárdy András Jakab László Rafai Pál, Zöldág László
Parazitológia Állattan Halkórtan	I. 22. szerda 8:30-	Hetzel Henrik előadóterem	Baska Ferenc Farkas Róbert	Eszterbauer Edit Hornung Erzsébet Sréter Tamás	Békési László, Csaba György Hornok Sándor, Kassai Tibor Molnár Kálmán Majoros Gábor, Varga István
Klinikumok	I. 23. csütörtök 8:30-	Tormay Béla előadóterem	Bodó Gábor Cseh Sándor Németh Tibor Vörös Károly	Bakos Zoltán Becker Zsolt Szelényi Zoltán	Biksi Imre, Gál János Szenci Ottó Vajdovich Péter

## TARTALOMJEGYZÉK

### Bakteriológia

1. TEJELŐ SZARVASMARHA ÁLLOMÁNYOK *COXIELLA BURNETII* FERTŐZÖTTségÉNEK VIZSGÁLATA KÖZÉP-KELET EURÓPAI ORSZÁGOKBAN  
Dobos Attila, Kreizinger Zsuzsa, Kovács Áron Botond, Gyuranecz Miklós
2. AZ EGY EGÉSZSÉG ELV VAD MADARAKBAN: KITERJEDT SPEKTRUMÚ BÉTA-LAKTAMÁZT TERMELŐ ENTEROBACTERALES ELŐFORDULÁSA VETÉSI VARJAKBAN (*CORVUS FRUGILEGUS*) ÉS KAPCSOLATUK HUMÁN EREDETŰ IZOLÁTUMOKKAL  
Nagy József Bálint, Kövér László, Balázs Bence, Gyüre Péter, Damjanova Ivelina, Tóth Ákos, Bali Krisztina, Bányai Krisztián, Kardos Gábor
3. *MYCOPLASMA ANSERISALPINGITIS* TÖRZSEK VIZSGÁLATA CORE GENOME MULTI-LOCUS SEQUENCE TYPING MÓDSZERREL  
Kovács Áron Botond, Forró Barbara, Gróznér Dénes, Mitter Alexa, Marton Szilvia, Bali Krisztina, Anna Sawicka, Bányai Krisztián, Gyuranecz Miklós
4. HŐÉRZÉKENY *MYCOPLASMA ANSERISALPINGITIS* VAKCINA JELÖLT KLÓNOK ELŐÁLLÍTÁSA  
Mitter Alexa, Gróznér Dénes, Gyuranecz Miklós
5. *MYCOPLASMA ANSERISALPINGITIS* ÉS *M. ANATIS* TÖRZSEK ÖSSZEHASONLÍTÓ GENETIKAI VIZSGÁLATA MULTI-LOCUS SEQUENCE TYPING (MLST) MÓDSZER SEGÍTSÉGÉVEL  
Gróznér Dénes, Kovács Áron Botond, Bekő Katinka, Anna Sawicka, Forró Barbara, Marton Szilvia, Bali Krisztina, Mitter Alexa, Kreizinger Zsuzsa, Jánosi Szilárd, Turcsányi Ibolya, Bányai Krisztián, Gyuranecz Miklós
6. *MYCOPLASMA ANSERISALPINGITIS* ELSŐ IZOLÁLÁSA KÍNAI HATTYÚLÚDBÓL (*ANSER CYGNOIDES*)  
Gyuranecz Miklós, Mitter Alexa, Gróznér Dénes, John Wang, Christopher J. Morrow
7. MACSKA NEPHRITIS ESETBŐL IZOLÁLT *FREDEKSENIA* SP. JELLEMZÉSE  
Ujvári Barbara, Szeredi Levente, Magyar Tibor
8. *PASTEURELLA MULTOCIDA* TÖRZSEK GENOTÍPUSOS ANTIMIKROBIÁLIS REZISZTENCIA-PROFIL VIZSGÁLATA  
Tóth Adrienn Gréta, Makrai László, Magyar Tibor, Balka Gyula, Solymosi Norbert
9. KITERJEDT SPEKTRUMÚ BÉTA-LAKTAMÁZ (ESBL) TERMELŐ BAKTÉRIUMOK ELŐFORDULÁSA ÉLELMISZERTERMELŐ ÁLLATOK BÉLSÁRMINTÁIBAN  
Balázs Bence, Kálmán Attila, Bistyák Andrea, Turcsányi Ibolya, Sárközi Rita, Nagy József Bálint, Tóth Zoltán, Nagy Fruzsina, Kardos Gábor

10. MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZER FEJLESZTÉSE A *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* K 5831 VAKCINATÖRZS ÉS VAD *M. GALLISEPTICUM* TÖRZSEK ELKÜLÖNÍTÉSÉRE  
Bekő Katinka, Kovács Áron Botond, Kreizinger Zsuzsa, Marton Szilvia, Bányai Krisztián, Bánáti László, Gyuranecz Miklós
11. ÁZSIAI EREDETŰ *MYCOPLASMA SYNOVIAE* ÉS *M. GALLISEPTICUM* TÖRZSEK ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLATA  
Kreizinger Zsuzsa, Bekő Katinka, Cécile Yvon, Robin Achari, Sang-Won Lee, Chris Morrow, Gyuranecz Miklós
12. ÚJ, MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZER FEJLESZTÉSE A VAD-TÍPUSÚ *MYCOPLASMA SYNOVIAE* TÖRZSEK ÉS AZ MS-H VAKCINA TÖRZS ELKÜLÖNÍTÉSÉRE  
Cécile Yvon, Kreizinger Zsuzsa, Wehmann Enikő, Dán Ádám, Gyuranecz Miklós
13. GENOTIPIZÁLÓ RENDSZEREK FEJLESZTÉSE *MYCOPLASMA HYORHINIS* TÖRZSEK ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATÁRA  
Földi Dorottya, Bekő Katinka, Felde Orsolya, Kreizinger Zsuzsa, Kovács Áron Botond, Tóth Fruzsina, Bányai Krisztián, Gyuranecz Miklós
14. *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* TÖRZSEK CSÖKKENT ANTIBIOTIKUM-ÉRZÉKENYSÉGÉNEK VIZSGÁLATA MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL  
Felde Orsolya, Kreizinger Zsuzsa, Sulyok Kinga Mária, Wehmann Enikő, Gyuranecz Miklós
15. KISKÉRŐDZŐKBŐL IZOLÁLT *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* ÉS *BIBERSTEINIA TREHALOSI* TÖRZSEK ANTIBIOTIKUM-ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLATA  
Tóth Gergely, Pintér Krisztina, Kiss Szonja Petra, Jánosi Szilárd, Makrai László, Fodor László
16. KISKÉRŐDZŐKBŐL IZOLÁLT *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* ÉS *BIBERSTEINIA TREHALOSI* TÖRZSEK SZEROTÍPUS-VIZSGÁLATA  
Tóth Gergely, Kiss Szonja Petra, Pintér Krisztina, Jánosi Szilárd, Makrai László, Fodor László
17. *SALMONELLA INFANTIS* ÉS *ESCHERICHIA COLI* GENOMOK MOBILIS REZISZTOM ANALÍZISE  
Szmolka Ama, Wami Haleluya, Pásztai Judit, Nagy Béla, Dobrindt Ulrich
18. P2-SZERŰ PROFÁG GÉNEK PREVALENCIÁJA CITOLETÁLIS DUZZASZTÓ TOXINT TERMELŐ ÉS NEM-TERMELŐ BOVIN *ESCHERICHIA COLI* TÖRZSEKBEN  
Sváb Domonkos, Tóth István
19. AZ R18C EGY ÚJ GENOTÍPUSÚ, ENTERÁLIS PATOGÉN BAKTÉRIUMOKAT FERTŐZŐ LÍTIKUS P2-SZERŰ BAKTERIOFÁG  
Sváb Domonkos<sup>1\*</sup>, Horváth Balázs<sup>2</sup>, Manfred Rohde<sup>3</sup>, Maróti Gergely<sup>4</sup>, Tóth István<sup>1</sup>

20. MULTIREZISZTENS BAKTÉRIUMOK ELŐFORDULÁSA  
DANKASIRÁLYOKBAN (*CHROICOCEPHALUS RIDIBUNDUS*) A DUNA  
BUDAPESTI SZAKASZÁN  
Koleszár Balázs, Nagy József Bálint, Balázs Bence, Lovas-Kiss Ádám, Kardos Gábor

### **Mikológia**

1. ÁLLATI ÉS EMBERI EREDETŰ *CANDIDA ALBICANS* IZOLÁTUMOK  
ÖSSZEHASONLÍTÓ MOLEKULÁRIS GENETIKAI VIZSGÁLATA  
Domán Marianna, Makrai László, Bali Krisztina, Lengyel György, Kovács Renátó,  
Majoros László, Bányai Krisztián

### **Viroológia, immunológia**

1. VAD ÉS VAKCINA EREDETŰ FERTŐZŐ BRONCHITIS VÍRUS TÖRZSEK  
KÖZÖTTI GENETIKAI INTERAKCIÓ VIZSGÁLATA TELJES GENOM ELEMZÉS  
SEGÍTSÉGÉVEL  
Bali Krisztina, Bálint Ádám, Farsang Attila, Marton Szilvia, Mató Tamás, Kiss István,  
Palya Vilmos, Bányai Krisztián
2. A NYUGAT-NÍLUSI VÍRUS ÉS MÁS FLAVIVÍRUSOK AKTIVITÁSA  
MAGYARORSZÁGON  
Fehér Orsolya Eszter, Forgách Petra, Marosi András, Malik Péter, Nagy Anna, Takács  
Mária, Korbacska-Kutasi Orsolya
3. CRESS DNS VÍRUSOK VIZSGÁLATA HAZAI VIZES ÉLŐHELYEKEN  
ELŐFORDULÓ VADMARAKBAN  
Kaszab Eszter, Lengyel György, Marton Szilvia, Dán Ádám, Bányai Krisztián, Fehér  
Enikő
4. A LÚD HAEMORRHAGIÁS POLYOMAVÍRUS FILODINAMIKAI VIZSGÁLATA  
Kaszab Eszter, Marton Szilvia, Dán Ádám, Farsang Attila, Bálint Ádám, Bányai  
Krisztián, Fehér Enikő
5. A SERTÉS PARVOVÍRUS 27A TÖRZS FERTŐZŐKÉPESSÉGÉNEK VIZSGÁLATA  
SERTÉS HERE ÉS SERTÉS VESE EREDETŰ SEJTVONALAKON  
Mészáros István, Tamás Vivien, Olasz Ferenc, Hornyák Ákos, Kiss István, Zádori Zoltán
6. AZ AFRIKAI SERTÉSPESTIS VÍRUS VP72 FŐ BUROKFEHÉRJE  
IMMUNHISZTOKÉMIAI MÓDSZERREL TÖRTÉNŐ KIMUTATÁSA  
TERMÉSZETES KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT FERTŐZÖDÖTT VADDISZNÓBAN  
Szeredi Levente, Bálint Ádám, Bakcsa Erika, Szajkiné dr. Szalay Dóra, Erdélyi Károly
7. AZ AFRIKAI SERTÉSPESTIS VÍRUS POLICITIZIN ÉS POLIGUANIN  
SZAKASZAINAK VIZSGÁLATA  
Tamás Vivien, Olasz Ferenc, Mészáros István, Ursu Krisztina, Zádori Zoltán

8. AZ AFRIKAI SERTÉSPESTIS VÍRUS VIZSGÁLATA SERTÉS PULMONÁLIS MACROPHÁGOKBAN  
Tamás Vivien, Mészáros István, Olasz Ferenc, Hornyák Ákos, Magyar Tibor, Zádori Zoltán
  
9. ROTAVÍRUS NSP1 GÉNEK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA AZ INTERFERON TERMELÉSRE SEJTKULTÚRÁBAN  
Varga-Kugler Renáta, Nagy Borbála Ágnes, Kaszab Eszter, Forró Barbara, Bányai Krisztián

## TEJELŐ SZARVASMARHA ÁLLOMÁNYOK *COXIELLA BURNETII* FERTŐZÖTTségÉNEK VIZSGÁLATA KÖZÉP-KELET EURÓPAI ORSZÁGOKBAN

Dobos Attila<sup>1\*</sup>, Kreizinger Zsuzsa<sup>2</sup>, Kovács Áron Botond<sup>2</sup>, Gyuranecz Miklós<sup>2,3</sup>

A Q-láz világszerte előforduló zoonótikus megbetegedés, amelyet 1937-ben írtak le először Ausztráliában. Kórokozója a *Coxiella burnetii*, amely Gram negatív intracelluláris baktérium. Számos állatfajt képes megfertőzni (pl. háziállatokat, hullóket, madarakat, tengeri állatokat és kullancsokat), melyek különböző módokon üríthetik a kórokozót (pl. vizelettel, bélsárral, tejjel, magzatburokkal). A fertőzött állatok leggyakrabban tünetmentesek, azonban szaporodásbiológiai problémákat (pl. vetelés, magzatburok retenciós, méhgyulladás) is összefüggésbe hoztak a kórokozó jelenlétével. A közép-kelet európai térségben sok esetben fordult elő fertőzött kérődzőkhöz köthető járványos humán megbetegedés. A kérődző állományok *C. burnetii* fertőzöttségét vizsgáló felmérések így fontos adatokat nyújthatnak a járványok megelőzéséhez.

A kutatás célja a tejelő szarvasmarha állományok *C. burnetii* fertőzöttségének felmérése volt hat közép-kelet európai országban, különböző állatlétszámú telepeken vett tanktej minták vizsgálatával.

A vizsgálatok során összesen 370 tanktej mintát gyűjtöttünk cseh, horvát, magyar, szerb, szlovák és szlovén tejelő tehenészetekből 2019 márciusa és októbere között. A szarvasmarha telepeket állatlétszám szerint négy kategóriába soroltuk: 50-250, 251-500, 501-1000, >1000. A tejminták szerológiai vizsgálatához kereskedelmi forgalomban kapható ELISA tesztet használtunk. A DNS kivonás után az *IS1111*-es régió alapuló, TaqMan típusú, real-time PCR rendszert alkalmaztuk a *C. burnetii* kimutatására ugyanazon tejmintákból.

Az állatlétszám alapján meghatározott kategóriák szerinti összehasonlításban pozitív korrelációt állapítottunk meg (Spearman-féle rangkorreláció elemzés,  $r=0,720$ ,  $p<0,001$ ) az állomány mérete és a *C. burnetii* fertőzöttség mértéke között. A térségben vizsgált, legalább 250 db tejelő állatot tartó szarvasmarha telepek esetében 98,32-100,00%-os pozitivitást találtunk az ELISA és/vagy PCR tesztek során, míg az 50-250 db tejelő állat kategóriában 73,03%-ban mutattunk ki *C. burnetii* specifikus ellenanyagokat, illetve nukleinsavat. Legtöbb esetben mindkét módszerrel végzett vizsgálat pozitív eredményt adott.

A régió országainak tejelő szarvasmarhatelepein a *C. burnetii* prevalencia magasabb, mint a nemzetközi átlag, feltételezhetően a koncentrált nagyüzemi szarvasmarhatartásnak köszönhetően. A tejtermelő nagyüzemi dolgozók így fokozottabban ki vannak téve a Q-láz fertőzés lehetőségének, ezért nagyobb figyelmet kell fordítani az ellések/vetélések során környezetbe jutó méhtartalom megsemmisítésére, ragályfogó eszközök fertőtlenítésére.

A kutatást a Ceva-Phylaxia Zrt., az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíja és az ITM Új Nemzeti Kiválóság Programja és Bolyai+ Ösztöndíja (ÚNKP-19-4-ÁTE-1) támogatták.



Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar,  
Orvosi Mikrobiológiai Intézet<sup>1</sup>

Bakteriológia

Természetvédelmi Állattani és Vadgazdálkodási Tanszék, Mezőgazdaság-,  
Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Debreceni Egyetem<sup>2</sup>

Nemzeti Népegészségügyi Központ<sup>3</sup>

ATK Állatorvos-tudományi Intézet<sup>4</sup>

\*nagy.jozsefb93@gmail.com

## AZ EGY EGÉSZSÉG ELV VAD MADARAKBAN: KITERJEDT SPEKTRUMÚ BÉTA-LAKTAMÁZT TERMELŐ ENTEROBACTERALES ELŐFORDULÁSA VETÉSI VARJAKBAN (*CORVUS FRUGILEGUS*) ÉS KAPCSOLATUK HUMÁN EREDETŰ IZOLÁTUMOKKAL

Nagy József Bálint<sup>1\*</sup>, Kövér László<sup>2</sup>, Balázs Bence<sup>1</sup>, Gyüre Péter<sup>2</sup>, Damjanova Ivelina<sup>3</sup>, Tóth Ákos<sup>3</sup>, Bali Krisztina<sup>4</sup>, Bányai Krisztián<sup>4</sup>, Kardos Gábor<sup>1</sup>

A Debreceni Egyetem klinikáinak területének fain a téli időszakban nagyszámú, főleg Ukrajnából és Oroszországból érkező vetési varjú (*Corvus frugilegus*) gyülekezik, ürülékük a klinikák területét szennyezi. Munkánk során felmértük az ESBL-termelő Enterobacterales előfordulását a varjakban, és az Egy egészség elv mentén haladva a kapott izolátumokat 2016 október és 2017 március közötti időszakból származó humán széklet és klinikai izolátumokkal hasonlítottuk össze.

Élvefogó csapdákkal befogott varjából 112 bélsármintát gyűjtöttünk, emellett 2455 rutin széklettenyésztésre küldött humán széklet mintát vizsgáltunk. Az izolátumokat ugyanabból az időszakból származó 42 humán klinikai eredetű ESBL-termelő *E. coli* izolátummal hasonlítottuk össze. A különböző *E. coli* filogenetikai csoportokat valamint a pandémiás 131-es szekvencia típusba (ST131) tartozó izolátumokat PCR-el, a blaSHV és blaCTX-M géneket szekvenálással azonosítottuk.

A varjából 43 (38%), a humán székletmintákból 42 (2%) ESBL-termelő *E. coli*-t izoláltunk. A varjakban leggyakrabban a blaCTX-M-55 (16/43) és a blaCTX-M-27 (13/43) gének fordultak, míg a humán minták esetében a blaCTX-M-15 és a blaCTX-M-27 volt a leggyakoribb a klinikai (18/42 és 13/42) és a széklet (20/42 és 10/42) izolátumokban egyaránt. A varjak és az emberek által hordozott izolátumok 56% és 68%-a kommenzális filogenetikai csoportokba, viszont a klinikai izolátumok 74%-a az extraintesztinális patogén B2 filogenetikai csoportba tartozott. A PFGE vizsgálat során a varjú és a humán eredetű izolátumok elkülönültek, de a humán széklet és klinikai izolátumok nem. A pandémiás 131-es szekvencia típus izolátumai (tíz klinikai és nyolc humán széklet izolátum) egy nagy csoportot alkottak, amely a két varjú eredetű ST131 C1-M27 kládba tartozó izolátumot is magában foglalta. Emellett még két esetben keveredtek egy csoporton belül a humán és a varjú eredetű izolátumok; egy kisebb csoport három klinikai, egy széklet és egy varjú eredetű izolátumból állt, továbbá egy madár izolátumok által dominált nagyobb csoport egy humán székletből származó izolátumot is tartalmazott.

A varjak jelentős rezervoárjai az ESBL-termelő *E. coli*-nak és a pandémiás ST131 C1-M27 klónhoz tartozó izolátumok is előfordultak bennük. Az ESBL-gének eloszlásai és az izolátumok makrorestrikciós profilja alapján a varjak szerepe humán infekciók közvetlen fertőző forrásaként csekély, viszont a rezisztens baktériumok és rezisztencia gének rezervoárjaiként illetve azokat akár nagyobb földrajzi távolságokon átvívó vektorokként szerepelhetnek.

Balázs Bencét támogatta az Innovációs és Technológiai Minisztérium Új Nemzeti Kiválóság Programja (ÚNKP-19-3-I.)

## MYCOPLASMA ANSERISALPINGITIS TÖRZSEK VIZSGÁLATA CORE GENOME MULTI-LOCUS SEQUENCE TYPING MÓDSZERREL

Kovács Áron Botond<sup>1\*</sup>, Forró Barbara<sup>1</sup>, Gróznér Dénes<sup>1</sup>, Mitter Alexa<sup>1</sup>, Marton Szilvia<sup>1</sup>, Bali Krisztina<sup>1</sup>, Anna Sawicka<sup>2</sup>, Bányai Krisztián<sup>1</sup>, Gyuranecz Miklós<sup>1,3</sup>

A *Mycoplasma anserisalpingitis* (más néven *Mycoplasma* sp. 1220) egy vízibaromfi patogén baktérium, amely rendszeresen izolálható libatartó telepeken. Az újgenerációs szekvenálás terjedése korszerű vizsgálati módszereket tesz elérhetővé a kutatók számára. Ilyen a core genome multi-locus sequence typing (cgMLST) módszer, amely a klasszikus MLST módszertől eltérően nem néhány háztartási gént vizsgál, hanem a törzsek ún. core genome-ját használja fel. Core genome-nak nevezik egy faj genomjának azt a részét, mely a vizsgált törzsek jelentős részében (általában 90-99%-ban) jelen van.

A vizsgálat célja egy olyan cgMLST séma kifejlesztése, amely lehetővé teszi a *M. anserisalpingitis* törzsek rokonsági kapcsolatainak feltérképezését.

Teljes genom szekvenálást végeztünk 79 magyar és lengyel származású *M. anserisalpingitis* törzsön Illumina NextSeq 500 NGS készülék segítségével. A genomokat a SPAdes szoftverrel illesztettük össze, majd a chewBBACA program csomag segítségével vizsgáltuk. A programok megkeresik a kódoló szekvenciák start és stop kodonjait, átfedés esetén a hosszúságuk alapján szelektálást végeznek, ezáltal annotálják a genomot. Ezt követően meghatároztuk a százalékos küszöbértéket 90%-ban és az ennél kevesebb törzsben jelenlévő kódoló szekvenciákat nem vettük figyelembe a rendszer létrehozásában. A kapott cgMLST sémából PhyloViz szoftver segítségével neighbor joining fát hoztunk létre, amelyet összehasonlítottunk a klasszikus MLST módszerrel kapott maximum likelihood fával.

Háromszáznyolcvankilenc kódoló szekvencia (CDS) került be a cgMLST vizsgálatba. A fejlesztett módszer azonos csoportba sorolta az egy földrajzi helyről származó *M. anserisalpingitis* törzseket. A készített törzsfá jelentősen egybevágott a klasszikus MLST rendszerből származó eredményekkel, sőt egyes törzsek esetében jobban is tükrözte a valós térbeli és időbeli viszonyokat.

A cgMLST módszer lehetőséget ad a *M. anserisalpingitis* törzsek rokonsági kapcsolatainak feltérképezésére, lehetővé teszi a faj genetikai változásainak nyomon követését, továbbá alkalmazható járványtani nyomozás során is.

A kutatást a Lendület, K\_16 (119594), FK17 (124019) és KKP19 (129751) pályázatok, továbbá az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíja és az ITM Új Nemzeti Kiválóság Programja és Bolyai+ Ösztöndíja (ÚNKP-19-4) támogatták.

## HŐÉRZÉKENY *MYCOPLASMA ANSERISALPINGITIS* VAKCINA JELÖLT KLÓNOK ELŐÁLLÍTÁSA

Mitter Alexa<sup>1,\*,#</sup>, Gróznér Dénes<sup>1,2,#</sup>, Gyuranecz Miklós<sup>1,2</sup>

A *Mycoplasma anserisalpingitis* (*M. sp.* 1220) vízibaromfi fajokat megbetegítő baktérium, amely a fertőzött állatokban fallusz és kloáka gyulladást, petevezető-gyulladást, csökkent tojás termelést, légzőszervi tüneteket okozhat, ezáltal jelentős gazdasági károkat képes előidézni az érintett állományokban. Az antibiotikumok megfelelő használata egy-egy járványkitörésnél kritikus fontosságú, azonban csak rövid távú megoldást kínál. Ezzel szemben a vakcinázás hosszútávú védekezést tesz lehetővé a megbetegedések megelőzésével, azonban *M. anserisalpingitis* elleni vakcina kereskedelmi forgalomban jelenleg nem kapható. *M. synoviae* elleni MS-H vakcinatörzs előállításánál során bizonyították, hogy kémiai mutagenézissel hőérzékeny, attenuált klónok állíthatók elő.

Kutatásunkban célul tűztük ki hőérzékeny *M. anserisalpingitis* vakcina jelölt klónok előállítását kémiai mutagenézis alkalmazásával.

A *M. anserisalpingitis* törzsgyűjteményünkben három, klinikai megbetegedésből izolált törzset választottunk ki. A kezelési protokoll kidolgozásánál az MS-H vakcina fejlesztési lépéseit vettük alapul. Az izolátumokat N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) mutagén 200, 400, 800, 1600 és 3200 µg/ml koncentrációival kezeltük, majd meghatároztuk a minták csíraszámát és további tenyésztést végeztünk. Ezek után különálló baktérium telepeket (klónokat) szaporítottunk fel, majd kópiaszámlálást végeztünk 33°C (permisszív) és 39,5°C (restriktív) hőmérsékleteken. Hőérzékenynek minősítettünk egy klónt, ha a permisszív hőmérsékleten történő inkubálás legalább százszoros nagyságrenddel magasabb kópiaszámot eredményezett, mint a restriktív hőfokon.

Az NTG hatással volt a *M. anserisalpingitis* mintákra, mivel a koncentráció növekedésével jelentősen csökkent a minták csíraszám. A 3200 µg/ml NTG koncentráció után már nem láttuk jelét a baktérium szaporodásának. Az alacsonyabb koncentrációval kezelt minták tenyésztése során 78 db *M. anserisalpingitis* klónt szaporítottunk fel és végeztük el a hőérzékenységi vizsgálatát. A 200 µg/ml NTG-vel kezelt mintákból 3 klón hőérzékenynek bizonyult, többszöri ellenőrzés alkalmával is.

A fertőzőtség gazdasági kártételének csökkentéséhez és az antibiotikum rezisztencia terjedésének visszaszorításához szükség van új, alternatív védekezési módok felderítésére. A hőérzékeny *M. anserisalpingitis* vakcina jelölt klónoknak vizsgálni fogjuk a kolonizációs képességét, ártalmatlanságát és hatásosságát. Reményeink szerint munkánk hozzájárul egy hatékony vakcina fejlesztéséhez.

A kutatást a Lendület, K\_16 (119594), FK17 (124019) és KKP19 (129751) pályázatok, továbbá az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíja és az ITM Új Nemzeti Kiválóság Programja és Bolyai+ Ösztöndíja (ÚNKP-19-4) támogatták.

## MYCOPLASMA ANSERISALPINGITIS ÉS M. ANATIS TÖRZSEK ÖSSZEHASONLÍTÓ GENETIKAI VIZSGÁLATA MULTI-LOCUS SEQUENCE TYPING (MLST) MÓDSZER SEGÍTSÉGÉVEL

Gróznér Dénes<sup>1,2,\*,#</sup>, Kovács Áron Botond<sup>1,#</sup>, Bekő Katinka<sup>1</sup>, Anna Sawicka<sup>3</sup>, Forró Barbara<sup>1</sup>, Marton Szilvia<sup>1</sup>, Bali Krisztina<sup>1</sup>, Mitter Alexa<sup>1</sup>, Kreizinger Zsuzsa<sup>1</sup>, Jánosi Szilárd<sup>4</sup>, Turcsányi Ibolya<sup>4</sup>, Bányai Krisztián<sup>1</sup>, Gyuranecz Miklós<sup>1,2</sup>

Ludakat és kacsákat fertőző baktériumok a *Mycoplasma anserisalpingitis* és a *M. anatis*. Társfertőzésben vagy akár önállóan is súlyos megbetegedéseket, ennek következtében pedig jelentős gazdasági károkat okozhatnak. A két faj biokémiai tulajdonságai megegyeznek és a típus törzsek genomjai is nagyban hasonlítanak egymásra. Annak ellenére, hogy a *M. anserisalpingitis* rendszeresen kimutatható vízibaromfi félékben, nem rendelkezünk ismeretekkel a törzsek gazda- vagy szervspecifitásáról, az évek során bekövetkező változásáról és az izolátumok telepek közötti eltéréseiről.

A kutatás célja multi-locus sequence typing (MLST) rendszer fejlesztése hazai és külföldi származású *M. anserisalpingitis* minták összehasonlító genetikai vizsgálatához. A vizsgálathoz outgroup csoportként a közeli rokon fajnak vélt *M. anatis*-t használtuk.

Meghatároztuk a teljes genom szekvenciáját 79 hazai és lengyel származású *M. anserisalpingitis* törzsnek. Több mint harminc háztartási gént gyűjtöttünk ki a genomokból, majd Simpson-féle diverzitás index, génszerkezet és genomi elhelyezkedés alapján csökkentettük a vizsgált gének számát. Primereket terveztünk és PCR reakciókat futattunk *Mycoplasma* törzseken, majd a PCR tesztek specificitásának és érzékenységének eredményei alapján 6 gént (*atpG*, *fusA*, *pfkB*, *pgiB*, *plsY*, *uvrA*) választottunk ki a végső MLST rendszerbe. A PCR reakciókat futtattuk külföldi származású klinikai mintákon és meghatároztuk a termékek bázis sorrendjét. A *M. anserisalpingitis* szekvenciák felhasználásával, továbbá *M. anatis* genomok bevonásával filogenetikai fát készítettünk.

A tervezett *M. anserisalpingitis* MLST rendszer 73 szekvencia típusba (ST) sorolta a hazai és a külföldi származású mintákat; a rendszert 0,925-ös Simpson-féle index jellemezte. Az azonos származású minták egyazon vagy közeli ST-ba sorolódtak. A filogenetikai fa alapján néhány minta rendkívül közeli rokonságot mutat a *M. anatis*-szal. A PCR reakciók futtathatóak klinikai mintákon, a PCR rendszerek érzékenysége 10<sup>3</sup> DNS templát.

Elsőként hoztunk létre MLST rendszert, amely lehetővé teszi a *M. anserisalpingitis* genotipizálását, ezáltal a minták leszármazási kapcsolatainak feltérképezését. Ezen felül rokoni kapcsolatot találtunk ezen faj és a *M. anatis* között.

A kutatást a Lendület, K\_16 (119594), FK17 (124019) és KKP19 (129751) pályázatok, az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíja, az ITM Új Nemzeti Kiválóság Programja és Bolyai+ Ösztöndíja (ÚNKP-19-4) és az ÁTE Doktori Iskola NKB pályázata támogatták.

## MYCOPALSMATA ANSERISALPINGITIS ELSŐ IZOLÁLÁSA KÍNAI HATTYÚLÚDBÓL (ANSER CYGNOIDES)

Gyuranecz Miklós<sup>1,2\*</sup>, Mitter Alexa<sup>1</sup>, Gróznér Dénes<sup>1,2</sup>, John Wang<sup>3</sup>, Christopher J. Morrow<sup>3,4</sup>

A *Mycoplasma anserisalpingitis* okozta megbetegedések hatalmas gazdasági károkat okoznak az európai libatenyésztésben. A mycoplasmosis következtében a magyar liba ágazat (26E tonna/év) éves becsült vesztesége 2,5-3 millió euró között mozgott az elmúlt évtizedben. A világ éves libahús termelése 2,5 millió tonna, melynek többségét azonban Kína (2,4 millió tonna) állítja elő, ahol nem az Európában elterjed házi ludat (*Anser anser*), hanem a kínai hattyúludat (*Anser cygnoides*) tenyésztik. Sem az angol nyelvű, sem a kínai szakirodalomban nem találtunk információt a kínai hattyúlúd *Mycoplasma* fajok okozta megbetegedéséről.

Vizsgáltunk célja az volt, hogy Kínában végzett mintagyűjtés keretében felmérjük a *M. anserisalpingitis* előfordulását kínai hattyúlúdban.

Munkánk során 2019. szeptemberében mintákat gyűjtöttünk egy 75 ezer szülőpárt számláló kínai hattyúlúd telepen Dél-Kínában, Kanton (Guangzhou) közelében. Elsőként a lúdállomány tulajdonosával és állatorvosával történt megbeszélés során próbáltunk információhoz jutni a *M. anserisalpingitis* okozta megbetegedés esetleges kínai előfordulásáról. Ezt követően az európai ludakban észlelt tünetekhez hasonló elváltozást mutató hattyúludakból, valamint klinikai tüneteket nem mutató egyedekből gyűjtöttünk kloaka és légső tampon mintákat. A mintákat részben FTA kártyákon fixáltuk, illetve a csoportunk által kifejlesztett *Mycoplasma* transzport táptalaj rendszerbe helyeztük, majd Magyarországra szállítottuk. A mintákat laboratóriumunkban a különböző vízi baromfi *Mycoplasma* fajokra specifikus PCR rendszerek segítségével vizsgáltuk, valamint *Mycoplasma* izolálást végeztünk. A kitenyésztett törzsek antibiotikum érzékenységi profilját (MIC) mikroleves hígítással állapítottuk meg, továbbá meghatároztuk a teljes genom szekvenciájukat (Illumina).

Az információgyűjtés során megtudtuk, hogy a kínai hattyúlúdban is előfordul falluszgyulladás, a tenyész gúnarak 1%-át érinti. A 13 vizsgált liba közül 6 madárból (3♀, 3♂) tudtuk kimutatni a *M. anserisalpingitis*-t, melyek közül 3-ból a törzset is sikerült izolálnunk. További 4 madárból *M. cloacale*-t és egy új, eddig ismeretlen *Mycoplasma* fajt sikerült kitenyésztenünk.

Vizsgálatunk során elsőként mutattuk ki a *M. anserisalpingitis* és az általa okozott kórkép előfordulását kínai hattyúlúdban. Feltételezéseink szerint a *M. anserisalpingitis* Európához hasonlóan Ázsiában is jelentős gazdasági károkat okoz. Reményeink szerint eredményeink ráirányítják az ázsiai állatorvosok/mikrobiológusok figyelmét is a betegségre/kórokozóra.

A kutatást a Lendület, K\_16 (119594), FK17 (124019) és KKP19 (129751) pályázatok, továbbá az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíja és az ITM Új Nemzeti Kiválóság Programja és Bolyai+ Ösztöndíja (ÚNKP-19-4) támogatták.

## MACSKA NEPHRITIS ESETBŐL IZOLÁLT *FREDERIKSENIA* SP. JELLEMZÉSE

Ujvári Barbara<sup>1\*</sup>, Szeredi Levente<sup>2</sup>, Magyar Tibor<sup>1</sup>

A *Pasteurellaceae* az egyik legtöbb tagot számláló baktériumcsalád. A családba tartozó baktériumfajok sokféle állatfajból és emberből is izolálásra kerültek, és többségüket opportunistáknak tartják számon. A *Pasteurellaceae* család évről évre új nemzetségekkel és fajokkal bővül. Kuttyák és macskák szájürege és felső légúti traktusában is gyakran azonosításra kerülnek a családba tartozó fajok, köztük a *Pasteurella* sensu stricto tagjai (*P. multocida*, *P. dagmatis*, *P. canis*, *P. stomatis* and *P. oralis*) vagy a *Frederiksenia canicola*. Az említett fajok gyakran izolálhatók humán bőrsérülések esetében is. A közelmúltban leírt, illetve leírásra váró új fajok ismerete egyaránt fontos az epidemiológiai kutatások és a rutin diagnosztikai laboratóriumok számára is.

Munkánk célja egy *Pasteurellaceae* család jelenleg leírt tagjaitól fenotípusos és genotípusos tulajdonságaiban is eltérő, macska eredetű izolátum jellemzése volt.

A baktériumizolálást 5% birkavért tartalmazó Columbia agaron végeztük. A kitenyésztett baktériumot biokémiai tesztekben vizsgáltuk tovább, és a fajazonosításhoz a 16S rDNS szekvencia elemzését végeztük el. A további filogenetikai vizsgálatokhoz az *rpoB* (RNS polimeráz béta alegysége), *recN* (DNS repair protein) és az *infB* (transzláció iniciációs faktor 2) génszakaszok szekvencia analízisét is elvégeztük. A baktérium antibiotikum érzékenységi profilját is meghatároztuk minimális gátló koncentráció (MIC) értéket megadó tesztsíkok segítségével. Az izolált baktérium gyors azonosítása érdekében egy PCR reakciót is terveztünk.

A veséből és a lépből nem hemolizáló, *Pasteurella*-szerű telepek nőttek szintenyészetben. Az izolált baktérium oxidáz, kataláz és indol tesztben pozitív eredményt adott, de negatívnak bizonyult ureáz és ornitin-dekarboxiláz próbában. Képes volt hasznosítani a glükózt, maltózt és xilózt, de nem bontotta a trehalózt, laktózt, arabinózt, dulcitol és szorbitot. A filogenetikai vizsgálatok során az izolátumot a *Pasteurellaceae* családba soroltuk, ugyanakkor a *Frederiksenia* nemzetségbe tartozó, de a *F. canicola* fajtól eltérő baktériumot azonosítottunk. Az izolátum meghatározására tervezett PCR reakcióval sikeresen meg tudtuk különböztetni vizsgált törzset a *Pasteurellaceae* családba tartozó egyéb baktériumfajoktól. A vizsgált törzs alacsony MIC értékeket adott a következő antibiotikumokkal szemben: penicillin, ampicillin, tetraciklin, doxiciklin, erythromicin, enrofloxacin, ciprofloxacin, nalidixsav, kloramfenikol, florfenikol, cefazolin, cefpodoxim, kolisztin, szulfomethoxazol, és trimethoprim/szulfomethoxazol. Emelkedett MIC értékeket tapasztaltunk streptomocinnal, gentamicinnal és klindamicinnal szemben.

Eredményeink arra utalnak, hogy a vizsgált izolátum egy eddig még nem leírt fajt képvisel a *Frederiksenia* nemzetségen belül, melyet a filogenetikai vizsgálatok is megerősítenek. A *Frederiksenia* nemzetség jelenleg csak a típusfajt (*F. canicola*) tartalmazza, melytől fenotípusos és genotípusos tekintetben is különbözik az általunk jellemzett izolátum. Eredményeink alapján elmondható, hogy a *Frederiksenia* nemzetség a jövőben új fajokkal bővíthet, köztük az általunk jellemzett izolátummal.

Állatorvostudományi Egyetem, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék<sup>1</sup>  
Agrártudományi Kutatóközpont, Állatorvos-tudományi Intézet<sup>2</sup>  
Állatorvostudományi Egyetem, Patológiai Tanszék<sup>3</sup>  
Állatorvostudományi Egyetem, Bioinformatikai Központ<sup>4</sup>  
\*tothadrienngréta@gmail.com

Bakteriológia

## PASTEURELLA MULTOCIDA TÖRZSEK GENOTÍPUSOS ANTIMIKROBIÁLIS REZISZTENCIA-PROFIL VIZSGÁLATA

Tóth Adrienn Gréta<sup>1,4\*</sup>, Makrai László<sup>1</sup>, Magyar Tibor<sup>2</sup>, Balka Gyula<sup>3</sup>, Solymosi Norbert<sup>4</sup>

Kutatásunk során *Pasteurella multocida* törzsek antimikrobiális rezisztencia-génkészletének, vagyis rezisztómjának összetételét, illetve az egyes rezisztencia-gének mobilitását vizsgáltuk. Mivel a *Pasteurella multocida* széles gazdaspektrummal rendelkező és jelentős gazdasági kártétellel járó megbetegedéseket okozó baktériumfaj, rezisztencia-mechanizmusainak pontosabb megértése fontos lehet.

Munkánk során célunk volt a különböző állatfaji és földrajzi eredetű *Pasteurella multocida* törzsek genotípusos antibakteriális rezisztencia-profiljának jellemzése. Megvizsgáltuk továbbá az azonosított AMR-gének genetikai környezetét, az esetleges terjedőképesség (mobilitás) lehetőségének felmérése céljából. A kiindulási DNS-szakaszainkat két AMR-gén (ARG) adatbázist (CARD, ResFinder) felhasználva vizsgáltuk, hogy a kapott eredményeket összehasonlíthassuk.

Negyvenkettő *Pasteurella multocida* törzs 17 különböző antibiotikummal szembeni antimikrobiális rezisztenciáját korongdiffúziós módszerrel vizsgáltuk, majd kiválasztottuk a 6 egymástól leginkább eltérő AMR-profillal rendelkező törzset. A törzsekből kialakított hat szintenyészet új generációs szekvenálással felmért genomját nagy mélységben lefedő readeket elemeztünk. Különböző bioinformatikai módszerekkel, illetve ARG adatbázisok alapján (CARD, ResFinder) azonosítottuk a mintákban jelen levő antimikrobiális rezisztenciagéneket, valamint azt is megvizsgáltuk, hogy ezek milyen szekvenciális környezetben találhatóak. Ez azért fontos, mert a mobilis genetikai elemeken elhelyezkedő gének a különböző horizontális géntranszfer-folyamatok révén átadódhatnak más baktériumoknak, ami az AMR terjedését segítheti.

Vizsgálatainknak köszönhetően összesen 18 különböző antimikrobiális rezisztenciagén-típust sikerült azonosítanunk, 17-et CARD, 9-et pedig ResFinder alapon. A ResFinder segítségével azonosított 9 géntípusból 8-at CARD alapon is sikerült kimutatnunk. Az egyes géntípusokat, vagy azok megfelelő hosszúságú töredékeit átlagosan nagyobb mennyiségben találtuk meg a CARD adatbázisra való illesztés során. CARD segítségével 12, ResFinder segítségével 10 mobilitást lehetővé tevő genetikai elem (transzpozáz gén) közvetlen szekvenciális környezetében elhelyezkedő rezisztenciagént detektáltunk.

Az eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy mekkora jelentősége lehet a modern szekvenálási eljárásokkal és bioinformatikai eszközökkel történő vizsgálatoknak az antimikrobiális rezisztencia genetikai hátterének megismerésében.

A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap (ESZA) társfinanszírozásával valósult meg (a támogatási szerződés száma: AZ EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00005).

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar,  
Orvosi Mikrobiológiai Intézet<sup>1</sup>  
HAGE Hajdúsági Agráripari Zrt.<sup>2</sup>  
NÉBIH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság Debreceni Laboratóriuma<sup>3</sup>  
magánállatorvos<sup>4</sup>  
\*balazsbence0903@gmail.com

Bakteriológia

## KITERJEDT SPEKTRUMÚ BÉTA-LAKTAMÁZ (ESBL) TERMELŐ BAKTÉRIUMOK ELŐFORDULÁSA ÉLELMISZERTERMELŐ ÁLLATOK BÉLSÁRMINTÁIBAN

Balázs Bence<sup>1\*</sup>, Kálmán Attila<sup>2</sup>, Bistyák Andrea<sup>3</sup>, Turcsányi Ibolya<sup>3</sup>, Sárközi Rita<sup>4</sup>, Nagy József Bálint<sup>1</sup>, Tóth Zoltán<sup>1</sup>, Nagy Fruzsina<sup>1</sup>, Kardos Gábor<sup>1</sup>

A Gram-negatív baktériumok béta-laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztenciája az egyik legsúlyosabb népegészségügyi probléma, amely leggyakrabban az 1983-ban megjelent kiterjedt spektrumú béta-laktamázok (ESBL) termeléséhez kapcsolódik. Ezek a törzsek megjelennek a humán és állati bél mikrobiótájában, és ezek között átadódhatnak. Emellett ez a tünetmentes hordozás fertőzések forrása lehet az állategészségügyben és a közegészségügyben egyaránt, összhangban az Egészségügyi Világszervezet (WHO) Egy egészség elvével. Jelen kutatás az ESBL termelő baktériumok előfordulását és antibiotikum rezisztenciáját méri fel élelmiszertermelő állatokban.

A kutatás során 100 sertés és 114 baromfi bélsár mintát vizsgáltunk meg. A mintákat 2 mg/L cefotaximmal kiegészített eozin-metilénkék táptalajra oltottuk, a kitenyészett baktériumokat MALDI-TOF-MS készülékkel identifikáltuk. Rezisztenciájukat EUCAST ajánlás alapján, korongdiffúziós módszerrel vizsgáltuk humán egészségügyben alkalmazott antibiotikumokkal szemben. Az ESBL fenotípus meghatározása kettős korong módszerrel történt.

A vizsgált 100 sertés bélsár mintából, 448 izolátum tenyésztett ki, ezek közül 84 izolátum jellemzése történt meg. A törzsek között 46 *Escherichia coli* (56,1%); 21 *Proteus spp.* (25,6%); 7 *Myroides odoratimimus* (8,5%); 5 *Citrobacter freundii* (6,1%); 2 *Morganella morganii* (2,4%) és 1 *Providencia rettgeri* (1,2%) fordult elő. A vizsgált izolátumok 89,2%- volt rezisztens cefotaximmal, 88,0%-a cefepimmal, 79,5% sulfamethoxazol/trimethoprimmal (SXT); 37,3%-a amikacinnal, 78,3%-a gentamicinnel és 47,0%-a tobramycinnel szemben. Minden izolátum érzékeny volt karbapenemekre és colistinre. A vizsgált sertés izolátumok közül 74 volt ESBL termelő, melyből 43 volt *E. coli*, 18 *Proteus spp.*; 5 *C. freundii*; 2 *M. morganii* és egy *P. rettgeri*.

A 114 csirke bélsár mintából 312 izolátum tenyésztett ki, melyből 109 *E. coli* izolátum került további vizsgálatra. Az izolátumok 12,8% volt rezisztens SXT-vel, 14,7%-a amikacinnal és tobramycinnel, 23,9%-a gentamicinnel szemben. Minden izolátum érzékeny volt ertapenemre és fosfomicinre, polymyxin rezisztenciát 2 izolátum mutatott. A vizsgált izolátumok közül 68 volt ESBL termelő és 43 ampC termelő.

Előzetes eredményeink alapján az élelmiszertermelő állatok bélsár mintáiban nagy gyakorisággal fordulnak elő multirezisztens baktériumok. A legjelentősebb szerepe a multirezisztencia hordozásában az *E. coli*-nak van, sertés esetében a *Proteus spp.* is jelentős.

Köszönetnyilvánítás: Balázs Bencét, Tóth Zoltánt, Nagy Fruzsínát támogatta az Innovációs és Technológiai Minisztérium, Új Nemzeti Kiválóság Program (ÚNKP-19-3-I.)



## MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZER FEJLESZTÉSE A *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* K 5831 VAKCINATÖRZS ÉS VAD *M. GALLISEPTICUM* TÖRZSEK ELKÜLÖNÍTÉSÉRE

Bekő Katinka<sup>1\*</sup>, Kovács Áron Botond<sup>1</sup>, Kreizinger Zsuzsa<sup>1</sup>, Marton Szilvia<sup>1</sup>, Bányai Krisztián<sup>1</sup>, Bánáti László<sup>1</sup>, Gyuranecz Miklós<sup>1,2</sup>

A *Mycoplasma gallisepticum* világszerte elterjedt fakultatív patogén kórokozó, mely pulykában és csirkében légúti megbetegedést és szaporodásbiológiai zavarokat idéz elő, ezáltal jelentős gazdasági károkat okoz a baromfiágazatban. A védekezés leghatékonyabb módja az állományok kórokozótól való mentesítése és a mentesség fenntartása, ez azonban számos állattartó telepen nem kivitelezhető. A hosszútávú védekezés másik lehetősége az állományok vakcinázása. Az élő vakcinatörzsek vad törzsektől való elkülönítése kulcsfontosságú a vakcinázási programok eredményességének ellenőrzésében és a diagnosztikában egyaránt.

Munkánk során a *M. gallisepticum* K vakcinatörzs (K 5831, Vaxxinova Inc., Japan) elkülönítésére szolgáló molekuláris biológiai módszer fejlesztését tűztük ki célul.

Ennek érdekében elvégeztük a K vakcinatörzs teljes genom szekvenálását, majd összehasonlítottuk azt egyéb *M. gallisepticum* törzsekhez tartozó génbanki szekvenciákkal. Számos K vakcinatörzsrre specifikus mutációt azonosítottunk, ezek közül összesen 7 pontmutációra terveztünk PCR (polymerase chain reaction)-alapú MAMA (mismatch amplification mutation assay) rendszert. A tesztekhez összesen 280 *M. gallisepticum* mintát használtunk, melyek között számos, a világ különböző országaiból származó klinikai mintákból és vad törzsek szintenyészeteiből izolált DNS minta szerepelt.

Eredményeink alapján az elkülönítésre az a rendszer bizonyult legmegfelelőbbnek, melyet a K vakcinatörzs *fruA* génjében talált pontmutáció (G88A) kimutatására terveztünk. Ez a 88. nukleotid pozícióban bekövetkező guanin-adenozin szubsztitúció aszparaginsav-aszparagin aminosav-cserét okoz a bakteriális foszfortranszferáz rendszerhez tartozó fruktóz-specifikus enzimben (EIIABC komponens). A tervezett MAMA rendszerben a vakcina-specifikus primert 14 bázispárnyi GC-farokkal jelöltük, mely méretkülönbség hagyományos (agaróz-MAMA) és valós idejű (melt-MAMA) PCR segítségével egyaránt kimutatható. A rendszer  $10^2$  (melt-MAMA) és  $10^3$  (agaróz-MAMA) kópiaszám/μl érzékenységgel működik és nem mutat keresztreakciót a madarakban gyakran előforduló egyéb *Mycoplasma* fajokkal.

Az általunk tervezett MAMA rendszer alkalmasnak bizonyult a K vakcinatörzs és a vad *M. gallisepticum* törzsek megbízható elkülönítésére, mely akár közvetlenül, klinikai mintákon is alkalmazható. Segítségével gyorsan és költséghatékonyan elvégezhető a vakcinázási programok hatékonyságának ellenőrzése valamint a vakcinázott állományok fertőzöttségének megállapítása.

A kutatást a Lendület, K\_16 (119594), FK17 (124019) és KKP19 (129751) pályázatok, továbbá az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíja és az ITM Új Nemzeti Kiválóság Programja és Bolyai+ Ösztöndíja (ÚNKP-19-4-ÁTE-1) támogatták.

## ÁZSIAI EREDETŰ *MYCOPLASMA SYNOVIAE* ÉS *M. GALLISEPTICUM* TÖRZSEK ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLATA

Kreizinger Zsuzsa<sup>1,\*,#</sup>, Bekő Katinka<sup>1,#</sup>, Cécile Yvon<sup>1</sup>, Robin Achari<sup>2</sup>, Sang-Won Lee<sup>3</sup>, Chris Morrow<sup>2</sup>, Gyuranecz Miklós<sup>1,4</sup>

A *Mycoplasma synoviae* és *M. gallisepticum* okozta baromfi mycoplasmosis súlyos gazdasági károkat eredményezhet a baromfiiparban a csökkent tojástermelés, romló keltethetőség, gyenge súlygyarapodás és emelkedett elhullási arány következtében. A fertőzések elleni védekezésben a mentesítés, vakcinázás és antibiotikumos gyógykezelés nyújtanak segítséget. Az ázsiai országokban az intenzív antibiotikum terápia ellenére kevés információ áll rendelkezésre a *Mycoplasma* fajok antibiotikum érzékenységéről.

A kutatás célja ázsiai eredetű *M. synoviae* és *M. gallisepticum* törzsek *in vitro* antibiotikum érzékenységi profiljának meghatározása volt nyolc, az állatorvosi gyakorlatban gyakran alkalmazott antibiotikum hatékonyságát vizsgálva.

A vizsgálatok során összesen 16 *M. synoviae* és négy *M. gallisepticum* törzs antibiotikum érzékenységét határoztuk meg hagyományos, mikro-leves hígítási módszerrel. A törzseket 2018-2019 között Kína, India, Indonézia, Fülöp-szigetek, Koreai Köztársaság és Thaiföld területén gyűjtött klinikai mintákból izoláltuk. A minimális gátló koncentrációkat (minimum inhibitory concentration, MIC) a tetraciklinek, pleuromutilinek, fenikolok, makrolidok, és a fluorokinolonok csoportjába tartozó antibiotikumok esetében vizsgáltuk.

Valamennyi törzssel szemben alacsony MIC értékeket állapítottunk meg oxitetraciklin, klórtetraciklin és tiamulin esetében. A florfenikol enyhén emelkedett MIC értékek mellett gátolta a törzsek növekedését. A törzsek többsége alacsony vagy enyhén emelkedett tilozin és tilmikozin koncentrációk esetében sem szaporodott, azonban néhány izolátum kifejezetten ellenállóknak bizonyult makrolidokkal szemben. A vizsgált törzsek növekedését, kevés kivételtől eltekintve, csak kimondottan magas enrofloxacin és difloxacin koncentrációk gátolták.

A baromfi mycoplasmosis kórokozóinak vizsgálatainkban megállapított csökkent érzékenysége a humán gyógyászatban is kiemelten fontos antibiotikum csoportokkal (fluorokinolonokkal és makrolidokkal) szemben felhívja a figyelmet a terápiára szánt antibiotikumok érzékenységi vizsgálatokon alapuló, megfelelő megválasztására. Emellett fontos lenne az egyéb védekezési lehetőségek (állathigiéniai előírások betartásának, vakcinázási programok bevezetésének) támogatása a vizsgált ázsiai országokban.

A kutatást a Lendület, K<sub>16</sub> (119594), FK17 (124019) és KKP19 (129751) pályázatok, továbbá az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíja és az ITM Új Nemzeti Kiválóság Programja és Bolyai+ Ösztöndíja (ÚNKP-19-4-ÁTE-1), valamint a Bioproperties Pty Ltd. támogatták.

## ÚJ, MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZER FEJLESZTÉSE A VAD-TÍPUSÚ *MYCOPLASMA SYNOVIAE* TÖRZSEK ÉS AZ MS-H VAKCINA TÖRZS ELKÜLÖNÍTÉSÉRE

Cécile Yvon<sup>1</sup>, Kreizinger Zsuzsa<sup>1</sup>, Wehmann Enikő<sup>1</sup>, Dán Ádám<sup>2</sup>, Gyuranecz Miklós<sup>1,3</sup>

A *Mycoplasma synoviae* világszerte elterjedt kórokozó, amely légzőszervi megbetegedéseket és fertőző synovitist okozhat csirkékben és pulykákban, valamint tojáshéj elváltozást eredményezhet tyúkokban. A fertőzés okozta gazdasági károk enyhítésére, illetve megelőzésére antibiotikumos kezelést, vakcinázást, valamint mentesítést javasolnak. A rendelkezésre álló élő vakcina törzsek közül az MS-H vakcina (Vaxsafe MS-H, Bioproperties Pty. Ltd. Ausztrália) egy kémiai mutagenézis révén attenuált *M. synoviae* törzs. Számos, pontmutációk azonosításán alapuló módszert fejlesztettek korábban a vakcina törzs megkülönböztetésére, azonban a mycoplasmákra jellemző nagy genetikai változatosság miatt a pontos diagnózis felállításához jelenleg a módszerek kombinált használata alkalmas csak.

A vizsgálat célja egy olyan molekuláris biológiai módszer fejlesztése volt, mely egy lépésben képes megkülönböztetni a vad-típusú *M. synoviae* törzseket az MS-H vakcina törzstől.

A vizsgálatok során alacsonyabb mutációs rátát mutató, háztartási génekben található, az MS-H vakcina törzsre specifikus pontmutációkat kerestünk, majd ezekre polimeráz láncreakció (PCR) alapú MAMA (mismatch amplification mutation assay) rendszereket fejlesztettünk. A MAMA rendszerekben eltérő méretű, a pontmutációkra specifikus, versengő primerek segítségével különböztetjük meg a genotípusokat a PCR termékek olvadási görbéjének, vagy méretének elemzése során. Teszteltük a kifejlesztett MAMA rendszerek érzékenységét, specifitását, és hogy alkalmasak-e a kevert fertőzések kimutatására. A kidolgozott, új molekuláris módszerrel a világ különböző országaiból származó, ismert genotípusú és vakcinázási háttérű 100 *M. synoviae* törzs és 30 klinikai minta DNS mintáját vizsgáltuk.

Vizsgálatainkban a *recA* háztartási gén 216. nukleotid pozíciójában található C/G pontmutáció azonosítására alkalmas MAMA rendszereket fejlesztettünk. A kifejlesztett módszerek  $10^3$  kópiaszám/ $\mu$ l érzékenységgel, keresztreakciók nélkül képesek elkülöníteni a vad-típusú *M. synoviae* törzseket az MS-H vakcina törzstől. A rendszer képes kevert fertőzések kimutatására is, valamint kongruens eredményeket adott a korábban kidolgozott genotipizáló módszerekkel a vizsgált minták esetében.

A kifejlesztett módszer alkalmas az MS-H vakcina gyors és költséghatékony elkülönítésére, elősegítve a vakcinázási programok során az immunizálás hatékonyságának ellenőrzését.

A kutatást a Lendület, K\_16 (119594), FK17 (124019) és KKP19 (129751) pályázatok, továbbá az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíja és az ITM Új Nemzeti Kiválóság Programja és Bolyai+ Ösztöndíja (ÚNKP-19-4-ÁTE-1) támogatták.

## GENOTIPIZÁLÓ RENDSZEREK FEJLESZTÉSE *MYCOPLASMA HYORHINIS* TÖRZSEK ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATÁRA

Földi Dorottya<sup>1\*</sup>, Bekő Katinka<sup>1</sup>, Felde Orsolya<sup>1</sup>, Kreizinger Zsuzsa<sup>1</sup>, Kovács Áron Botond<sup>1</sup>, Tóth Fruzsina<sup>2</sup>, Bányai Krisztián<sup>1</sup>, Gyuranecz Miklós<sup>1,2</sup>

A *Mycoplasma hyorhinis* a Mollicutes osztály, *Mycoplasma* nemzetségébe tartozó, sejtfal nélküli baktérium. Felnőtt sertésekben a felső légúti baktériumközösség természetes tagja, ezzel szemben 3-10 hetes malacokban szisztémás megbetegedést alakíthat ki, melynek jellegzetes tünetei a savóshártyák fibrines gyulladása, ízületi gyulladás, ritkább esetben középfülgyulladás és kötőhártya gyulladás. Az utóbbi években egyre nagyobb számban mutatják ki *M. hyorhinis* jelenlétét a tüneteket mutató malacokból. Ezért felmerül az igény a kórokozó alaposabb megismerésére, amelyben segítenek új, jól reprodukálható, nagy felbontóképességű genotipizáló rendszerek.

Vizsgálatunk során célunk volt a *M. hyorhinis* specifikus MLST (multi-locus sequence typing) rendszer továbbfejlesztése, mely nagyobb felbontóképesség mellett robusztusabb topológiájú törzsfák elkészítésére alkalmas. Emellett célunk volt egy nagy felbontóképességű, járványtani nyomozásokban alkalmazható MLVA (multiple-locus variable-number tandem repeat analysis) rendszer kidolgozása, valamint a két módszerrel kapott eredmények összevetése.

A módszerek fejlesztése összesen 37 hazai *M. hyorhinis* izolátum és a típus törzs (NCTC 10130) bevonásával történt. Az MLST módszer háztartási gének nukleotid sorrendjének vizsgálatán alapul. Az új rendszer kialakításakor a szakirodalomban leírt, nagy változatosságot mutató háztartási géneket válogattunk ki. Az MLVA módszer tandem ismétlődő régiók méretének összehasonlításával tesz különbséget a vizsgált törzsek között. Az új rendszer fejlesztése során a vizsgálatba bevont tandem ismétlődő régiókat a nyilvános adatbázisokban elérhető teljes genomok elemzése során választottuk ki. Mind a háztartási gének, mind a tandem ismétlődő génszakaszok felszaporítására PCR rendszereket terveztünk. A 38 törzs vizsgálata során kapott eredményeket MLST esetében maximum likelihood, MLVA esetében neighbour-joining módszerekkel készült törzsfákön ábrázoltuk.

A fejlesztett MLST rendszerben hat génszakaszt vizsgálunk (*lepA*, *rpoB*, *rpoC*, *valS*, *glxX*, *uvrA*). A szakaszok alapján a vizsgált 38 törzs 31 szekvencia típusba sorolható, a kisebb csoportokat elsősorban az azonos helyről, de eltérő években izolált törzsek alkotják. Az MLVA rendszerben hat tandem ismétlődő régiót vizsgáltunk, a felhasznált 38 törzs 37 genotípusra különült el. Mindkét rendszer magas Simpson diverzitás értékeket (MLST: 0,986; MLVA: 0,998) mutatott a hazai törzsek elemzése alapján.

A módszerek a hazai *M. hyorhinis* törzsek nagyfokú diverzitását tárták fel. Az eredmények alapján a fejlesztett rendszerek alkalmasak a törzsek járványtani és filogenetikai vizsgálatára.

A kutatást a Lendület, K\_16 (119594), FK17 (124019) és KKP19 (129751) pályázatok, továbbá az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíja és az ITM Új Nemzeti Kiválóság Programja és Bolyai+ Ösztöndíja (ÚNKP-19-4-ÁTE-1) támogatták.

## MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE TÖRZSEK CSÖKKENT ANTIBIOTIKUM-ÉRZÉKENYSÉGÉNEK VIZSGÁLATA MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL

Felde Orsolya<sup>1\*</sup>, Kreizinger Zsuzsa<sup>1</sup>, Sulyok Kinga Mária<sup>1</sup>, Wehmann Enikő<sup>1</sup>, Gyuranecz Miklós<sup>1,2</sup>

Az antibiotikumos kezelés fontos szerepet játszik a sertések mycoplasma pneumóniájáért felelős *Mycoplasma hyopneumoniae* által okozott klinikai tünetek enyhítésében és a fertőzés visszaszorításában. A megfelelő antibiotikum kiválasztása a terápia sikeressége és a rezisztencia terjedésének megelőzése szempontjából egyaránt fontos. A kezelést megelőző antibiotikum-érzékenységi vizsgálatra azonban a kórokozó körülményes és időigényes tenyésztése miatt általában nem kerül sor. Szakirodalmi adatok alapján bizonyos génekben előforduló pontmutációk összefüggésbe hozhatók egyes antibiotikumokkal szemben tapasztalt emelkedett minimális gátló koncentráció értékekkel. Így az ezeket célzó molekuláris biológiai vizsgálatok megfelelőek lehetnek az antibiotikum-érzékenységi profil gyors meghatározására.

Célunk a *M. hyopneumoniae* törzsek rezisztenciáért felelős génjeiben a csökkent antibiotikum-érzékenységgel összefüggő markerek azonosítása és ezek PCR-alapú detektálása volt.

Az általunk vizsgált, antibiotikum-rezisztenciáért felelős géneket szakirodalmi adatok alapján választottuk ki. A pontmutációk jelenlétéről a Geneious szoftver 10.2.3 verziójának használatával, Sanger-szekvenálás segítségével győződünk meg. A rezisztencia markerként azonosított pontmutációkra mismatch amplification mutation assay (MAMA) és high resolution melt (HRM) rendszereket terveztünk. A MAMA tesztek esetén az amplitonokat méretük alapján különítettük el, míg a HRM vizsgálat során a termékek nukleotid szekvenciájának eltéréseit olvadásgörbe analízis segítségével detektáltuk.

A fluorokinolon érzékenység kimutatására a *gyrA* (Gly81Ala, Ala83Val, Glu87Gly) és *parC* (Ser80Phe/Tyr, Asp84Asn) génekben található aminosav cserét okozó pontmutációkat célozva 5 MAMA rendszert terveztünk, melyek sikeresen elkülönítették az antibiotikumra érzékeny és rezisztens törzseket. Továbbá a *parC* génben található pontmutációk egyidejű kimutatására HRM rendszert fejlesztettünk, melynek segítségével a rezisztens törzseken belül további alcsoportokat is el tudunk különíteni a különböző genotípusoknak megfelelően. A csökkent makrolid és linkozamid érzékenység kimutatására a 23S rRNS kódoló gén 2059. nukleotid pozícióját célzó MAMA rendszert fejlesztettünk, mely sikeresen azonosította a csökkent antibiotikum-érzékenységet mutató törzseket.

Az általunk tervezett MAMA és HRM vizsgálatok gyors és költséghatékony antibiotikum-érzékenységi profil meghatározást tesznek lehetővé. A baktérium tenyésztését igénylő hagyományos módszerek kiegészítéseként hozzájárulhatnak a sertésállományok célzott antibiotikum terápiájának kialakításához, a *M. hyopneumoniae* okozta gazdasági károk csökkentéséhez, valamint az antibiotikum-rezisztencia terjedésének visszaszorításához.

A kutatást a Lendület, K\_16 (119594), FK17 (124019) és KKP19 (129751) pályázatok, továbbá az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíja és az ITM Új Nemzeti Kiválóság Programja és Bolyai+ Ösztöndíja (ÚNKP-19-4-ÁTE-1) támogatták.

## KISKÉRŐDZŐKBŐL IZOLÁLT *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* ÉS *BIBERSTEINIA TREHALOSI* TÖRZSEK ANTIBIOTIKUM-ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLATA

Tóth Gergely<sup>1\*</sup>, Pintér Krisztina<sup>1</sup>, Kiss Szonja Petra<sup>1</sup>, Jánosi Szilárd<sup>2</sup>, Makrai László<sup>1</sup>, Fodor László<sup>1</sup>

Bár Magyarországon a juh- és a kecskehús fogyasztása igen alacsony, de az élő bárány és bárányhús fontos exportcikk. A *Mannheimia haemolytica* és *Bibersteinia trehalosi* okozta pasteurellosis juh- és kecskeállományokban gyakran előforduló, főleg bárányokban és gidák esetében nagy gazdasági kárt okozó betegség. A károkat rendszerint antibiotikus kezeléssel mérséklük. Vizsgálataink célja az volt, hogy meghatározzuk a magyarországi kiskérődzőkben előforduló *M. haemolytica* és *B. trehalosi* törzsek antibiotikum-érzékenységét.

Vágóhidakról (Hetes, Csapod, Kardoskút, Dömsöd) illetve intézeti diagnosztikai anyagból (NÉBIH ÁDI Budapest, NÉBIH ÁDI Debrecen, Állat-egészségügyi Labor Diagnosztikai Szolgáltató Kft. - Békéscsaba, ÁTE Patológia ill. Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék) származó izolátumokból *M. haemolytica* és *B. trehalosi* törzsgyűjteményt hoztunk létre. Ezek közül csak a kórtani elváltozást mutató esetekből származókat, valamint az azonos származási helyeken belül szerotípusonként csak 1-1 törzset vontunk be a vizsgálatba, így 37 településről 58 *M. haemolytica* és 10 *B. trehalosi* törzset vizsgáltunk.

Az antibiotikum-érzékenységi vizsgálatot leveshígítós mikromódszerrel végeztük 9 antibiotikummal (amoxicillin, ceftiofur, enrofloxacin, florfenikol, gentamicin, linkomicin-spektinomycin, oxitetraciklin, szulfometoxazol-trimetoprim, tiamulin).

Eredményeink alapján a magyarországi *M. haemolytica* és *B. trehalosi* törzsek többsége érzékeny volt amoxicillin, ceftiofur, enrofloxacin, florfenikol, oxitetraciklin, szulfometoxazol-trimetoprim és tiamulin antibiotikumokra. A gentamicin és linkomicin-spektinomycin antibiotikumokkal szemben csökkent érzékenységet és gyakori rezisztenciát észleltünk. Vizsgálati eredményeink szerint pasteurellosis kezelésére az amoxicillin, a ceftiofur, a florfenikol, enrofloxacin és a tiamulin a leghatékonyabbak, de megfelelő az oxitetraciklin és a szulfometoxazol-trimetoprim kombináció is. A *B. trehalosi* törzsek érzékenysége általában kisebb tartományba esett, mint a *M. haemolytica* törzseké.

A vizsgálatot a közeljövőben szeretnénk kiterjeszteni amoxicillin-klavulánsav, tulatromicin, és tilmikozin antibiotikumokra is.

Köszönjük a hetesi, csapodi, kardoskúti és dömsödi vágóhidak vezetőinek a mintavétel engedélyezését. Köszönjük a NÉBIH ÁDI Emlős- Vad és Baromfibeetegségek Osztály és a Bakteriológia Osztály munkatársainak segítségét. Továbbá köszönjük a mintaküldők közreműködését. A kutatást az Állatorvostudományi Egyetem NKB pályázata támogatta.

## KISKÉRŐDZŐKBŐL IZOLÁLT *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* ÉS *BIBERSTEINIA TREHALOSI* TÖRZSEK SZEROTÍPUS-VIZSGÁLATA

Tóth Gergely<sup>1\*</sup>, Kiss Szonja Petra<sup>1</sup>, Pintér Krisztina<sup>1</sup>, Jánosi Szilárd<sup>2</sup>, Makrai László<sup>1</sup>, Fodor László<sup>1</sup>

A juh- és kecskeállományokban gyakran előforduló és nagy gazdasági kárt okozó betegség a különböző fajok által okozott pasteurellosis. A járványtani nyomozáson túl a szerotípus meghatározásának jelentősége a hatékony vakcinák összeállításában rejlik, mivel a *Mannheimia haemolytica* és a *Bibersteinia trehalosi* esetében a védelem szerotípus-specifikus. Vizsgálataink célja az volt, hogy felmérjük a Magyarországon kiskérődzőkben előforduló *M. haemolytica* és *B. trehalosi* törzsek szerotípusát, azok eloszlását, és az esetleges összefüggéseket a kórformák és állatfajok tekintetében.

Mintáink aktív és passzív monitoring keretében vágóhidakról (Hetes, Csapod, Kardoskút, Dömsöd) illetve intézeti diagnosztikai anyagból (NÉBIH ÁDI Budapest, NÉBIH ÁDI Debrecen, Állat-egészségügyi Labor Diagnosztikai Szolgáltató Kft. - Békéscsaba, ÁTE Patológia ill. Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék) származtak. Összesen 42 településről 146 *M. haemolytica* és 11 *B. trehalosi* és 2 *M. glucosida* törzset izoláltunk illetve gyűjtöttünk össze. A törzsek 129 juh és 30 kecske esetből, ezeken belül 97 tüdőből, 26 orrból, 12 hörgőből, 7 garatból, 7 szemből, 4 parenchymás szervből (lép, máj), 2 tejből, 1 tőgyből, 1 tályogból és 1 agyvelőből származtak. A szerotípus meghatározását eddig 142 esetben végeztük el. A törzsek szerotípusizálását passzív hemagglutinációs módszerrel végeztük. Ehhez nyulakban hiperimmun savót állítottunk elő

Juhok esetében az A13 és az A14 szerotípusokon kívül az összes szerotípus előfordult, míg kecskék esetében csak az A2, A6, T3 és T4. A leggyakoribb szerotípus *M. haemolytica* esetében az A2 (37%) volt, ezt követte rendre az A1 (13%), A12 (11%), A9 (9%), A7 (8%), A8 (7%), A6 (6%), A5 (5%), A16 és A17 (1-1%). *B. trehalosi* esetében a leggyakoribb szerotípus a T4 (46%) volt, míg a többi szerotípus egyenlő arányban fordult elő (T3, T10, T15 – 18-18%). 12 törzs (8%) nem besorolható volt, ezek legnagyobb része szemből, és orrból származott. Valamennyi szerotípust sikerült kórtani elváltozást mutató szervek izoláltuk, még az A11-es szerotípusú *M. glucosidát* is 2 tüdőgyulladásos esetből. Ez alapján egy szerotípust sem tekinthetünk apatogénnek. Tüdőgyulladásos esetből valamennyi szerotípust izoláltuk. Vérfertőző esetekből A2, A12, T4 és T15 szerotípusokat mutattuk ki. Mastitises esetekben A2, A5, A7 szerotípusok fordultak elő. A ritkább szerotípusok esetében sem látunk nagyobb arányú előfordulást egyéb szervekben, mint a tüdőben. Tanszékünkön végzett korábbi szerotípusizálások eredményeihez képest az új izolátumokban feltűnő az A12 és A9 szerotípusok korábinál nagyobb aránya. A szakirodalmi adatok szerint az A2-es szerotípus szarvasmarhában is a leggyakoribb, de e fajban inkább kevésbé patogénnek tartják, míg kiskérődzők esetében az adataink alapján patogenitás szempontjából is a legjelentősebb szerotípus.

Köszönetünket fejezzük ki a hetesi, csapodi, kardoskúti és dömsödi vágóhidak vezetőinek a mintavétel engedélyezéséért. Köszönjük a NÉBIH ÁDI Emlős- Vad és Baromfibetegségek Osztály és a Bakteriológia Osztály munkatársainak segítségét. Továbbá köszönjük a mintaküldők közreműködését. A kutatást az Állatorvostudományi Egyetem NKB pályázata támogatta.

## SALMONELLA INFANTIS ÉS ESCHERICHIA COLI GENOMOK MOBILIS REZISZTOM ANALÍZISE

Szmolka Ama<sup>1\*</sup>, Wami Haleluya<sup>2</sup>, Pászti Judit<sup>3</sup>, Nagy Béla<sup>1</sup>, Dobrindt Ulrich<sup>2</sup>

A broiler állományokban nagymértékben elterjedt multirezisztens *S. Infantis* és *E. coli* törzsek csökkentik a hazai baromfihús fogyasztói értékét és piacképességét. Feltételezésünk szerint ennek egyik mozgatórugója a két multirezisztens baktérium együttes jelenléte, mely lehetővé teszi a mobilis rezisztencia determinánsok (összességében a mobilis rezisztomok) fajon belüli és nemzetségek közötti átrendeződését és szelekcióját a broiler populációban.

A fentiek alapján jelen kutatás célja a broiler eredetű *S. Infantis* és *E. coli* törzsek mobilis rezisztomjának és genom diverzitásának összehasonlító analízise.

Összesen 90 multirezisztens *E. coli* (kommenzalista és patogén) valamint 56 *S. Infantis* (broiler és humán) törzs teljes genom szekvencia (WGS) alapú jellemzését végeztük el. A mobilis rezisztencia géneket és plazmid típusokat *in silico* a ResFinder és PlasmidFinder web-es alkalmazások segítségével mutattuk ki. A *S. Infantis* és *E. coli* törzsek klonalitását MLST (multilocus sequence typing) segítségével határoztuk meg, míg a klónokon belüli genom-diverzitást cgMLST (core genome MLST) segítségével jellemeztük.

A mobilis rezisztom analízis szerint az *E. coli* törzseket a mobilis rezisztencia gének nagyfokú diverzitása jellemezte, közülük leggyakrabban az 1-es típusú integronra jellemző gén-kazettákat (*aadA*, *dfr*, *sul*) és a plazmid-mediálta *bla*<sub>TEM-1</sub> és *tet(A)* géneket azonosítottuk. A törzsek többsége multiplazmidos volt. A különböző plazmid típusok és az ún. emerging típusú plazmidokon kódolt *bla*<sub>CMY-2</sub> és *qnrS* gének gyakrabban fordultak elő a kommenzalista mint a patogén *E. coli* törzsekben.

A *S. Infantis* törzsekben mindössze néhány rezisztencia gént és plazmid típust azonosítottunk az *E. coli* törzsekre jellemző rezisztencia gyakorisággal és diverzitással szemben. A *S. Infantis* törzsek többségében társultan előforduló *aadA1*, *sull* és *tet(A)* gének a pSI54/04 multirezisztencia megaplazmidhoz köthetők, amely a hazánkban járványtanilag domináns B2 PFGE klón törzseire jellemző.

Az MLST analízis az *E. coli* törzseket 49 szekvencia típusba (ST) sorolta, melyek közül leggyakrabban az ST10, ST117 és ST162 fordultak elő. A *S. Infantis* törzsek mindegyike az ST32 szekvencia típusba tartozott. A cgMLST analízis szerint a fenti domináns *E. coli* klónok és az epidémiás B2 *S. Infantis* klón is nagyfokú genom-diverzitást mutattak.

Eddigi eredményeink arra utalnak, hogy a *S. Infantis* és *E. coli* közötti rezisztom-csere vonatkozásában egyelőre néhány gén tekinthető potenciális transzfer jelöltnek, melyben az IncI és IncX plazmidoknak lehet szerepe.

Jelen kutatást az NKFI K 128600 projekt és a Heinrich Hertz Alapítvány támogatta. Az *E. coli* törzsek egy részét Dr. Markos Béla és Dr. Szalay Csaba jóvoltából kaptuk, míg a *S. Infantis* törzsek egy részét Dr. Adrián Erzsébetnek köszönjük.



## P2-SZERŰ PROFÁG GÉNEK PREVALENCIÁJA CITOLETÁLIS DUZZASZTÓ TOXINT TERMELŐ ÉS NEM-TERMELŐ BOVIN *ESCHERICHIA COLI* TÖRZSEKBE

Sváb Domonkos\*, Tóth István

A citoletális duzzasztó toxin (CDT) a gátló hatású ciklomodulinok prototípusa. Számos Gram-negatív, mind a humán-, mind az állategészségügyben jelentős kórokozó baktérium virulencia faktora. Különböző patotípusú patogén *Escherichia coli* törzsekben öt genetikai változata (CDT-I-V) ismert, közülük a CDT-V az enterohemorragiás (EHEC) és atípusos O157 szerocsoportú törzsek gyakori virulencia faktora. A *cdt-V* operon egy P2-szerű profágon kódolt, ami több törzs esetében indukálható és transzdukálható. Korábban beszámoltunk a P2-szerű profág-gének elterjedtségéről magyarországi szarvasmarhákból izolált O157 szerocsoportú, atípusos patotípusú, CDT-termelő és CDT-negatív törzsekben.

Célunk volt magyarországi szarvasmarha-állományokból újonnan történő izolálással *E. coli* törzsgyűjtemény létrehozása, ennek tagjai közt a *cdt* és a P2-szerű profág-gének gyakoriságának és eloszlásának meghatározása, valamint egymáshoz való asszociáltságuk megállapítása.

A baktériumtörzseket egészséges szarvasmarhák bélsarából, tejéből és néhány esetben az istállók környezetéből (takarmány, alom) az *E. coli* O157 törzsek izolálásához javasolt ISO protokollt követve izoláltuk. Vizsgálatainkhoz felhasználtunk továbbá szarvasmarhákból a NÉBIH ÁDI által azonos időszakban izolált törzseket is. A *cdt* hordozását irodalmi PCR tesztekkel ellenőriztük, a P2-szerű profág-gének jelenlétét korábban, valamint a jelen munka során általunk tervezett primerek segítségével ellenőriztük.

Összesen 309 mintát vettünk egészséges szarvasmarhák bélsarából, tejéből és környezetéből, továbbá 184 szarvasmarha-eredetű törzset kaptunk vizsgálatra. A *cdt+* törzsek (n=27) gyakorisága összességében 5,5% volt. Öt törzs kivételével CDT-III vagy CDT-V típusú géneket hordoztak. A *cdt+* törzseket valamint további tizenhat *cdt-* törzset vizsgáltunk meg a P2-szerű profág-gének jelenlétére. A *cdt+* törzsek átlagosan 7,6, míg a *cdt-* törzsek átlagosan 3,5 profág-gént hordoztak. Öt *cdt+* törzs esetében igazoltuk a P2-szerű profág régió és a *cdtABC* operon kapcsoltóságát. Három törzs esetében a *cdt C* szabályozó génből több változatot is detektáltunk ugyanabban a törzsben.

A *cdt+* törzsek előfordulási gyakorisága összhangban van korábbi irodalmi eredményekkel. A *cdt+* és *cdt-* törzsek összehasonlítása alapján a P2-szerű profág gének hordozása a *cdt*-pozitivitáshoz kötődik, nyolc gén kizárólag *cdt+* törzsekben fordult elő. Legalább három törzs esetén feltételezhető, hogy akár több P2-szerű profágot is hordoznak.

A minták gyűjtéséért köszönet illeti Jurkovich Viktort és Makrai Lászlót (Állatorvos-tudományi Egyetem), törzsek rendelkezésre bocsátásáért Jánosi Szilárdot (NÉBIH ÁDI). A laboratóriumi munkában Kotogán Eszter volt segítségünkre. A munka anyagi háttérét az NKFIH 124335 számú projektje biztosította. Sváb Domonkos az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíjának támogatásában részesült.

## AZ R18C EGY ÚJ GENOTÍPUSÚ, ENTERÁLIS PATOGÉN BAKTÉRIUMOKAT FERTŐZŐ LÍTIKUS P2-SZERŰ BAKTERIOFÁG

Sváb Domonkos<sup>1\*</sup>, Horváth Balázs<sup>2</sup>, Manfred Rohde<sup>3</sup>, Maróti Gergely<sup>4</sup>, Tóth István<sup>1</sup>

Világszerte súlyos gondot jelent a bakteriális kórokozók–antibiotikum-rezisztenciája. Az ellenük történő védekezés egyik alternatív lehetősége a lítikus bakteriofágoknak antibakteriális ágensként való, biokontroll célú alkalmazása. Ezért különösen fontos új bakteriofágok izolálása, fenotípusos és genomikai jellemzése.

Célunk volt enterális patogéneket oldani képes, potenciális biokontroll bakteriofágok izolálása, és jellemzése. Jelen munka tárgyát egy új, Myoviridae családba tartozó P2-szerű bakteriofág jellemzése képezte.

Az R18C bakteriofágot házinyúl bélsárból elődúsítást követően *E. coli* K-12 MG1655 törzsön történt lágyagaros rétegzéssel (spot assay) izoláltuk. Ugyanezen módszerrel határoztuk meg a fág gazdaspektrumát és gazdaspecifikus oldási hatékonyságát (EOP, efficiency of plating) több patotípust képviselő *E. coli*, *Shigella* és *Citrobacter rodentium* törzseken. Az egy gazdasejtből felszabaduló fágok mennyiségét (burst size) egylépéses növekedési kísérlettel mértük meg. A fág morfológiáját transzmissziós elektronmikroszkópiával határoztuk meg. A genom szekvencia meghatározása Illumina NextSeq platformon történt, a szekvenciaillesztést Spades 3.13.0 programmal, az annotációt a RAST szerver segítségével végeztük. A nukleotid- és fehérjeszekvencia összehasonlításokhoz a BLASTN, PSI-BLAST és EasyFig programokat használtuk. A filogenetikai vizsgálatok VICTOR programmal történtek.

Az R18C morfológiai alapon a Myoviridae családba tartozik. Az izoláláshoz használt *E. coli* K-12 törzshöz képest magasabb EOP-vel alkalmas gazdájának bizonyult a *C. rodentium* ICC169 típus törzs, továbbá két *S. sonnei* törzs, melyek közül az egyik Shiga toxin termelő volt, továbbá egy enteroinvazív *E. coli* (EIEC) törzs is. A burst size 100 új fág/gazdasejt volt. A fág genomja 31.834 bp hosszúságú lineáris duplaszálú DNS, 45 ORF-et tartalmaz, GC aránya 51,6%. Genetikailag a P2-szerű fágok közé, a Peduovirinae alcsaládba tartozik, és a csoport többi tagjához hasonlóan genomszerkezete és szekvenciája is erősen konzervált. Három jellegzetes integrációs helyen az R18C fág is tartalmaz moronokat (a fág életciklusához közvetlenül nem szükséges géneket), melyek ismeretlen funkciójú fehérjéket kódolnak.

Az R18C az elsőként jellemzett állati eredetű lítikus P2-szerű bakteriofág, és az első, aminek meghatároztuk a burst size értékét. Konzervált genomszerkezete mellett ritka és ismeretlen funkciójú moron géneket hordoz. A *C. rodentium* típus törzsének hatékony oldásának jelentősége, hogy e baktériumfaj az enteropatogén és enterohaemorrhágiás *E. coli* (EPEC, EHEC) modellorganizmusa rágcsálókban.

Munkánk anyagi háttérét NKFIH 124335 számú projektje biztosította. Sváb Domonkos az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíjának támogatásában részesült.

## MULTIREZISZTENS BAKTÉRIUMOK ELŐFORDULÁSA DANKASIRÁLYOKBAN (*CHROICOCEPHALUS RIDIBUNDUS*) A DUNA BUDAPESTI SZAKASZÁN

Koleszár Balázs<sup>1\*</sup>, Nagy József Bálint<sup>2</sup>, Balázs Bence<sup>2</sup>, Lovas-Kiss Ádám<sup>3</sup>, Kardos Gábor<sup>2</sup>

Közismert tény, hogy a bélflóra rezisztens törzsek rezervoárja lehet, azonban ez a kérdéskör vad madarakban kevésbé vizsgált, annak ellenére, hogy vonulási-kóborlási viselkedésükkel a rezisztencia potenciális terjesztői lehetnek. A sirályok, táplálkozási stratégiájuk és éves mozgásmintázatuk miatt különösen nagy terjesztési potenciállal rendelkeznek, urbanizációjuk pedig az ember-madár interakciók számának növekedésével jár. Vizsgálatunk a multirezisztens Enterobacterales és a vancomycin-rezisztens enterococcusok (VRE) előfordulását mérte fel a dankasirályok bélflórájában a Duna budapesti szakaszán 2019 január-március között.

A madarakat hurokkal és kis méretű, manuálisan elsüthető csapóhálójával fogtuk be, majd meggyűrűztük. A gyűrűzési procedúra során vettünk mintát steril tamponnal madarak ürülékéből. A 3. generációs cefalosporin rezisztens Gram-negatív bélbaktériumokat 2 mg/l cefotaximmal kiegészített eozin-metilénkék táptalajon, a vancomycin rezisztens enterococcusokat VRE screen-agaron kerestük. A kitenyészett izolátumokat MALDI-TOF-MS segítségével azonosítottuk, majd korongdiffúziós módszerrel rezisztencia vizsgálatot végeztünk, EUCAST ajánlás alapján. A kiterjedt spektrumú béta-laktamáz (ESBL) termelést kettős-korong teszttel, a carbapenemáz termelést MASTDISCS Combi Carba Plus teszttel vizsgáltuk. A VRE izolátumok esetében a vancomycin és a teicoplanin minimális gátló koncentrációit (MIC) E-teszttel határoztuk meg.

Multirezisztens Gram negatív izolátumokat a mintázott madarak 59,4%-a (73/123) hordozott, belőlük 82 izolátum ESBL, 31 ampC béta-laktamáz-, 10 pedig karbapenemáz termelőnek bizonyult. Emellett a madarak 3,3%-a (4/123) volt VRE pozitív. Az ESBL termelők többsége *Escherichia coli* volt (71/82), de *Klebsiella pneumoniae*-t (10/82) és *Citrobacter spp.*-t is izoláltunk. A ciprofloxacin (40/82), sulfamethoxazol/trimetoprim (SXT) (40/82), amikacinnal (24/82), gentamicinnel (15/82) és tobramycinnel (24/82) szemben is magas korezisztenciát tapasztaltunk. Colistinnel szemben két izolátum volt rezisztens. Az ampC termelő izolátumok esetében is az *E. coli* dominált (17/30). A korezisztencia sokkal ritkább volt (6/30 ciprofloxacin, 5/30 SXT-vel, 3/30 amikacinnal, 3/30 tobramycinnel, 1/30 colistinnel szemben rezisztens izolátumot találtunk, gentamicin rezisztencia nem fordult elő). A karbapenemáz termelők között négy metallo-béta-laktamáz (MBL) és egy OXA-48 fenotípusú *E. coli*, két MBL fenotípusú és egy OXA-48 fenotípusú *K. pneumoniae*, valamint egy MBL fenotípusú és egy porindeficiens fenotípusú *Enterobacter spp.* fordult elő. A négy VRE izolátum mindegyike *Enterococcus faecium* volt, három vanA és egy vanB fenotípust mutatott.

A sirályok tehát mind Gram-negatív, mind a Gram-pozitív multirezisztens izolátumokat hordozhatnak és ezek potenciális terjesztői lehetnek.

Balázs Bencét támogatta az Innovációs és Technológiai Minisztérium Új Nemzeti Kiválóság Programja (ÚNKP-19-3-I.) Lovas-Kiss Ádámot a Bolyai János Kutatási ösztöndíj támogatta.

ATK Állatorvos-tudományi Intézet<sup>1</sup>

Mikológia

Állatorvostudományi Egyetem, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék<sup>2</sup>

Magyar Honvédség Egészségügyi Központ, Járványügyi Virologiai Laboratórium<sup>3</sup>

Debreceni Egyetem, Orvosi Mikrobiológiai Intézet<sup>4</sup>

\*doman.marianna@agrar.mta.hu

## ÁLLATI ÉS EMBERI EREDETŰ *CANDIDA ALBICANS* IZOLÁTUMOK ÖSSZEHASONLÍTÓ MOLEKULÁRIS GENETIKAI VIZSGÁLATA

Domán Marianna<sup>1\*</sup>, Makrai László<sup>2</sup>, Bali Krisztina<sup>1</sup>, Lengyel György<sup>3</sup>, Kovács Renátó<sup>4</sup>, Majoros László<sup>4</sup>, Bányai Krisztián<sup>1</sup>

Az opportunistá patogén gombák állati és emberi megbetegedéseket egyaránt okozhatnak. A mikózisok gazdasági kártételének hátterében a növekedést, szaporodást, a fertőzésekkel szembeni ellenálló képességet negatívan befolyásoló hatások állnak. A háziállatokban előforduló candidiasisok epidemiológiájáról kevés adat áll rendelkezésre a nemzetközi irodalomban, illetve Magyarországon ilyen jellegű felmérés ez idáig nem történt.

Tervezett kutatásaink célja az állati és emberi eredetű *Candida albicans* izolátumok teljes genomjának összehasonlító elemzése, valamint az izolátumok molekuláris epidemiológiai vizsgálata. Az eukarióta genom komplexitása miatt a teljes genomok összehasonlító elemzésével alaposabban vizsgálhatjuk a virulencia faktorokat, illetve azok változatosságát a különböző izolátumok között, a gombaellenes szerekkel szembeni rezisztencia mechanizmusok genetikai hátterét és ezek terjedését. Jelen előadásunkban az előzetes felméréseink eredményeit mutatjuk be.

Vizsgálatainkat libák és kacsák begymikózisából származó 51 izolátummal, egy struccból és egy sólyomból származó izolátummal, valamint 6 emberi izolátummal végeztük el. A fajmeghatározás a teljes ITS (internal transcribed spacer) rRNS régió amplifikálásával, majd a termékek Sanger szekvenálásával történt. A *C. albicans* izolátumokat multi-locus sequence typing (MLST) rendszerrel genotipizáltuk.

A legtöbb begyűjtött mintából *C. albicans*-t tenyésztettünk ki, emellett más gomba fajokat is azonosítottunk begymikózisból (*C. krusei*, *C. inconspicua*, *Magnusiomyces capitatus*, *Trichosporon asahii*, *C. kefyr*, *C. pelliculosa*, *C. rugosa*, *C. lambica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania bovina*). A szakirodalomban a *C. albicans*-t tartják a begymikózisok hátterében az elsődleges kórokozónak, vizsgálataink azonban rámutattak, hogy más fajoknak is lehet etiológiai szerepe a begymikózis kialakításában. Közülük különösen érdekes egyes, emberben jelentős mortalitást okozó és gombaellenes szerekkel szemben többnyire jelentős rezisztenciát mutató fajok (*M. capitatus* és *T. asahii*) azonosítása. Az MLST vizsgálat során a *C. albicans* izolátumok között 8 esetben olyan allélkombinációt azonosítottunk, melyek nem szerepelnek a nemzetközi adatbázisban. Megállapítottuk továbbá, hogy egyes *C. albicans* genotípusok állatokban és emberekben egyaránt előfordulhatnak. A *C. albicans* genotípusok fajok közötti átvitelének lehetőségét érdemes lehet tovább vizsgálni az epidemiológiai és molekuláris genetikai módszerek kiterjesztésével.

Munkánk anyagi fedezetét a Magyar Tudományos Akadémia Lendület programja biztosította. Domán Marianna munkáját a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal PD\_18 (128617) pályázata támogatta.

## VAD ÉS VAKCINA EREDETŰ FERTŐZŐ BRONCHITIS VÍRUS TÖRZSEK KÖZÖTTI GENETIKAI INTERAKCIÓ VIZSGÁLATA TELJES GENOM ELEMZÉS SEGÍTSÉGÉVEL

Bali Krisztina<sup>1\*</sup>, Bálint Ádám<sup>2</sup>, Farsang Attila<sup>3</sup>, Marton Szilvia<sup>1</sup>, Mató Tamás<sup>3</sup>, Kiss István<sup>3</sup>, Palya Vilmos<sup>3</sup>, Bányai Krisztián<sup>1</sup>

A csirkék fertőző bronchitise magas morbiditással járó vírusos eredetű megbetegedés. A fertőző bronchitis vírusa (IBV) lipid burokkal és körülbelül 27 kb hosszúságú szimpla szálú, pozitív RNS genommal rendelkezik. Az IBV törzsek genotipizálása és filogenetikai vizsgálata legtöbbször az IBV S1 gén elemzésén alapszik. Ennek a viszonylag rövid genomi régióknak a meghatározása azonban a virális evolúció szempontjából gyakran nem nyújt elegendő információt.

Kutatásunk során célul tűztük ki a rendelkezésünkre álló hazai és nemzetközi gyűjtésből származó IBV törzsek genetikai jellemzését, és az egyes törzsek között fellépő rekombináció lehetőségének vizsgálatát.

Egy nagyobb törzsgyűjteményből összesen 20 európai (öt hazai, egy fehéroroszországi, négy görögországi, egy lengyelországi, egy portugáliai, hét romániai, és egy ukrainai) eredetű IBV törzs teljes genomjának meghatározását végeztük el random RT-PCR-rel történő amplifikációt követő újgenerációs szekvenálási módszer segítségével (Ion Torrent PGM és Illumina NextSeq 500 platformokon). A konszenzus szekvenciák összeállítását követően filogenetikai és rekombináció elemzést végeztünk. Az elemzésekhez további 49, a GenBank adatbázisában elérhető teljes IBV genom szekvenciát is felhasználtunk.

A vizsgált IBV genomok 27348-27845 nukleotid hosszúságúak voltak és 84,7-99,9% nt hasonlóságot mutattak egymással, illetve az elemzésbe bevont génbanki IBV genomokkal végzett összehasonlításban. Az újonnan megszekvenált IBV törzsek S1 génjének filogenetikai vizsgálatával öt genotípust azonosítottunk (két-két törzs a GI-1 és GI-21, egy a GI-9, négy GI-13, 11 GI-19), amelyek közül a GI-21 általánosan elterjedt Európában, míg a GI-1, GI-13 és GI-19 genotípusok globálisan is gyakoriak. A rekombinációs mintázatok elemzéséhez bevont teljes IBV genom szekvenciák közül 36 vad típusú, 33 vakcina eredetű törzs volt. Összesen 302 rekombinációs eseményt azonosítottunk, számos genom esetében több rekombinációs törésponttal. Bár a rekombinációs események időbeli sorrendjét nem tudtuk megállapítani, a magyarországi és európai eredetű vad, illetve vakcina IBV törzsek közötti rekombinációs események genotípus specifitástól függetlenül gyakoriak. A rekombináció, mint a vírus diverzitásáért felelős kulcsfontosságú evolúciós mechanizmus, befolyásolhatja az IBV törzsek pato-, szero- és protektotípusát, éppen ezért e gyorsan változó vírus elleni védekezés során a megfelelő vakcinatörzsek kiválasztásánál érdemes lehet a rekombinációra való hajlamot is vizsgálni.

A kutatómunka anyagi fedezetét a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal K120201 számú pályázata biztosította.

Állatorvostudományi Egyetem Takarmányozástani Tanszék<sup>1</sup>  
ÁTE Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék<sup>2</sup>  
NÉBIH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság<sup>3</sup>  
NNK Virologiai Laboratóriumi Osztály,  
Virális Zoonózisok Nemzeti Referencia Laboratóriuma<sup>4</sup>  
\*feher.orsolya@univet.hu

Virologia, Immunológia

## A NYUGAT-NÍLUSI VÍRUS ÉS MÁS FLAVIVÍRUSOK AKTIVITÁSA MAGYARORSZÁGON

Fehér Orsolya Eszter\*<sup>1</sup>, Forgách Petra<sup>2</sup>, Marosi András<sup>2</sup>, Malik Péter<sup>3</sup>, Nagy Anna<sup>4</sup>, Takács Mária<sup>4</sup>, Korbacska-Kutasi Orsolya<sup>1</sup>

Az elmúlt, 2018-as évben rekord számú Nyugat-nílusi vírus (NyNV) okozta idegrendszeri megbetegedést észleltünk hazánkban és Európa számos más országában mind lovakban, mind emberekben. Míg az első hazai NyNV járvány esetén 2008-ban csak 16 ló betegedett meg, 2016-ban 56 esetet, majd 2018-ban 91 bizonyítottan NyNV okozta megbetegedést diagnosztizáltunk. A magas esetszám mellett előfordultak olyan szezonális heveny idegrendszeri megbetegedések, melyek klinikai lefolyásukban a NyNV jellegzetességeit mutatták, azonban a nemzetközi (OIE) előírásokon alapuló IgM ELISA vizsgálaton negatívnak bizonyultak.

A tanulmányunk során szerettünk volna információt nyerni a NyNV, illetve esetlegesen más jelenlévő flavivirus hazai loállományt érintő aktivitásáról és a tünetmentesen fertőződött egyedek arányáról.

A 2018-as szezont követően 112 egészséges, idegrendszeri tüneteket nem mutató, NyNV ellen nem vakcinázott lovat vizsgáltunk IgG ELISA teszttel, amely lovak 72,3 %-a bizonyult szeropozitívnak. A vizsgált minták közül 73 esetben vírusneutralizációs eljárásban mértük az ellenanyagok titerértékét, amely során a két eljárás 94,5 %-ban azonos eredménnyel zárult. Négy esetben bár az IgG ELISA vizsgálat pozitív lett, a vírusneutralizációban azonban a NyNV fertőzés nem volt igazolható. Nyolc olyan lovat vizsgáltunk, melyek a 2018. vagy a 2019. szezonban akut idegrendszeri tünetet mutattak, de IgM ELISA teszten negatívnak bizonyultak. Ezen lovak IgG ELISA vizsgálata 80 %-ban pozitívan zárult, majd vírusneutralizációval vizsgáltuk őket, a lehetséges más flavivirus fertőzések azonosítása céljából.

Az eddigi szerológiai vizsgálatok eredménye alapján nem kizárható, hogy mind a tünetmentes fertőzések, mind a szezonális idegrendszeri megbetegedések némelyikét, valamilyen más flavivirus okozza. A tünetmentesen NyNV-vel fertőződött lovak esetében olyan titerértékeket mértünk (1:64<), amelyek a NyNV antigén tulajdonságait tekintve, megfelelő védelmet nyújtanak egy esetleges megbetegedéssel szemben.

Köszönetünket fejezzük a Normatív Kutatásfinanszírozási Bizottságnak (NKB) és az Állatorvostudományi Egyetem Doktori Iskolájának (ÁTE ÁODI) a kutatásokhoz nyújtott támogatásaikért.

## CRESS DNS VÍRUSOK VIZSGÁLATA HAZAI VIZES ÉLŐHELYEKEN ELŐFORDULÓ VADMARAKBAN

Kaszab Eszter<sup>1\*</sup>, Lengyel György<sup>2</sup>, Marton Szilvia<sup>1</sup>, Dán Ádám<sup>3</sup>, Bányai Krisztián<sup>1</sup>, Fehér Enikő<sup>1</sup>

A *Circoviridae* víruscsaládba tartozó circovírusok és cyclovírusok körülbelül 1700-2100 bázis hosszúságú cirkuláris, egyszálú DNS genommal rendelkező vírusok, melyeket a replikációban elsődleges szerepet játszó *rep* és a kapszid fehérjét kódoló *cp* gén elhelyezkedése alapján különböztetünk meg. Az utóbbi néhány évben számos, a *Circoviridae* családba nem sorolható, de genom szintű szerkezeti hasonlóságot mutató vírust írtak le, melyekre a *Circoviridae* család tagjaival együtt CRESS (circular Rep-encoding single-stranded) DNS vírusként hivatkoznak. CRESS DNS vírusokat gerinces és gerinctelen élőlényekben és környezeti mintákban is leírtak, melyek eredete és etiológiai szerepe legtöbb esetben kérdéses.

Vizsgálatainkhoz vizes élőhelyek környékén előforduló vadmadaraktól származó, influenza vírus szűrésre érkezett kloáka tampon mintákat (n=90) használtunk fel circo- és cyclovírusok kimutatására. Tanulmányunk célja a kimutatott vírusok teljes genomszekvenciájának jellemzése volt.

A minták DNS állományának kivonását követően szűrővizsgálat gyanánt univerzális circovírus/cyclovírus specifikus primereket használtunk a *rep* gén részleges szekvenciájának amplifikálására. A kapott PCR termékek nt sorrendjének ismeretében további primerpárokat terveztünk a vírusok teljes genomjának felsokszorozására, majd azokat szekvenálásnak vetettük alá.

A PCR 30 minta esetében amplifikált circo- és cyclovírus eredetű szekvenciákat. Teljes genom analízisünk három különböző vírus, a *Goose circovirus*, a már új fajként elfogadott *Duck associated cyclovirus 1* (DuACyV-1) és a szintén újonnan leírt *Garrulus glandarius associated circular virus 1* (GgaCV-1) jelenlétét igazolta mintáinkban.

Az egyes vírusok eloszlása madárfajtól független, az adott vizes élőhelyhez, illetve földrajzi régióhoz kötött mintázatot mutatott. A vizsgálatba bevont madár fajok jelentős része vonuló életmódot folytat, amely elősegíti a vírusok térbeli szóródását. Bár a vírus sikeres szaporodására alkalmas gazdafaj ismeretlen, a víz megfelelő közvetítő közeg lehet a vírusok átadására. A potenciális gazdafajokra és környezetre is kiterjedő mintavételezés elősegítheti a vizsgált vírusok szerepének feltárását adott ökológiai rendszerben, illetve a vírusok esetleges járványtani szerepének meghatározását.

A projekt anyagi fedezetét a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal K120201 számú pályázata, valamint az MTA Lendület programja biztosította. Fehér Enikő és Marton Szilvia munkáját a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János ösztöndíja támogatta.

## A LÚD HAEMORRHAGIÁS POLYOMAVÍRUS FILODINAMIKAI VIZSGÁLATA

Kaszab Eszter<sup>1</sup>, Marton Szilvia<sup>1</sup>, Dán Ádám<sup>2</sup>, Farsang Attila<sup>3</sup>, Bálint Ádám<sup>4</sup>, Bányai Krisztián<sup>1</sup>, Fehér Enikő<sup>1\*</sup>

A lúd haemorrhagiás polyomavírus (GHPV, *Anser anser polyomavirus 1*) egy kisméretű kettős szálú DNS genommal rendelkező vírus. A GHPV által okozott betegséget először Magyarországon regisztrálták 1969-ben. A fiatal egyedek megbetegedése súlyos belső szervi rendellenességekkel, idegrendszeri tünetekkel és elhullással járhat. A vírus szaporodik kacsákban is, tünetek kiváltása nélkül.

Tanulmányunk célja Magyarországon leírt GHPV törzsek genomjának meghatározása és filodinamikai jellemzése volt.

A NÉBIH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságán 2005 és 2019 között 1111 lúd és kacska belső szerv és bélsár mintában vizsgálták a GHPV előfordulását, és 384 esetben azonosították azt. Éves viszonyításban a beérkező minták száma és a GHPV pozitív minták száma hullámzó tendenciát mutatott, a 2008, 2013 és 2016 években mérhető csúcsokkal. Összesen 22 új GHPV törzs teljes genom szekvenciáját határoztuk meg, köztük az első járványos előfordulások során gyűjtött törzsét. A genomok szerkezete és a kódolt gének hossza megegyezik a szakirodalomban leírtakkal.

Az elérhető GHPV szekvenciák felhasználásával evolúciós elemzéseket végeztünk. A becsült evolúciós ráta  $10^{-5}$  –  $10^{-6}$  s/s/y nagyságrendű a teljes genom szekvenciák és egyedi gének esetében. A házi víziszárnyasokból származó szekvenciákon túl vadmadár eredetű VP1 szekvenciákat is bevontunk a vizsgálatokba. Az analízis emelkedett,  $10^{-4}$  s/s/y nagyságrendű szubsztitúciós rátát eredményezett, ami a vírus gazdához történő adaptációja miatt felhalmozódó nt változások miatt lehetséges. A szelekciós analízis szerint a GHPV genomokra/génekre negatív szelekciós nyomás hat. A VP1 génből készített időskálázott filogenetikai fán az 1969-ből származó törzs elkülönült kládként jelent meg. A másik kládban a 2010 előtt és után gyűjtött magyar minták jellemzően külön szubkládot alkottak. A 2010 utáni időszakból származó szekvenciák Lengyelországban leírt lúd, kacska és vadmadár szekvenciákkal csoportosultak. A törzsek filogenetikai értelemben vett elhelyezkedése felveti a különböző vírustörzsek egyidejű cirkulációját, egyes törzsek időközönként felbukkanását, illetve újak megjelenését, melyekért a betegségből felépült egyedek, a környezeti kontamináció, illetve a rezervoár szervezetek tehetők felelőssé.

Bár a polyomavírusokat lassan evolválódó, kevés gazdafajhoz kötődő vírusként jellemzik, tanulmányunk arra utal, hogy a GHPV az ismert gazdafajok mellett vadmadarakban is képes szaporodni. A vonuló madarak elősegíthetik a vírusok szóródását, új vírustörzsek behurcolását.

A projekt anyagi fedezetét a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal PD115519 és K120201 számú pályázata biztosította. Fehér Enikő és Marton Szilvia munkáját a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János ösztöndíja támogatta.



## A SERTÉS PARVOVÍRUS 27A TÖRZS FERTŐZŐKÉPESSÉGÉNEK VIZSGÁLATA SERTÉS HERE ÉS SERTÉS VESE EREDETŰ SEJTVONALAKON

Mészáros István<sup>1\*</sup>, Tamás Vivien<sup>1</sup>, Olasz Ferenc<sup>1</sup>, Hornyák Ákos<sup>1</sup>, Kiss István<sup>2</sup>, Zádori Zoltán<sup>1</sup>

Az ezredforduló után több tanulmányt is publikáltak, amelyek olyan új sertés parvovírus (PPV) törzsek megjelenéséről tudósítottak, amelyek ellen a forgalomban lévő vakcinák gyengébb védelmet nyújtanak (az egyik legjobban jellemzett a PPV 27a törzs). A publikált vizsgálatok alapján, az immunizálás során termelődött ellenanyagok rosszabb hatásfokkal neutralizálják az új izolátumokat, ami felveti annak a lehetőségét, hogy az évtizedek óta alkalmazott vakcinák már nem nyújtanak teljes védelmet a betegség ellen.

Szakirodalmi adatok sokasága áll rendelkezésre arról, hogy különböző parvovírus törzsek azonos sejtvonalat eltérő hatékonysággal képesek megfertőzni. Mivel a vírusneutralizációs (VN) tesztekben hagyományosan az azonos vírusmennyiségeket TCID<sub>50</sub> érték alapján adják meg, ezért a különböző fertőzőképességű törzseknél az azonos TCID<sub>50</sub> érték eltérő számú viriont reprezentál. Ez az eltérés pedig megnehezíti vagy akár lehetetlenné teszi a vírusneutralizációs tesztek eredményeinek értékelését.

A PPV 27a törzs fertőzőképességének vizsgálata PT és PK15 sejtvonalakon, abból a célból, hogy felhívjuk a figyelmet TCID<sub>50</sub> alapú VN tesztek korlátaira.

A vírusminták (PPV 27a, NADL-2, K22 vakcinatörzs) titerének meghatározásához hígítási sort készítettünk, amelyekkel PT és PK15 sejteket fertőztünk. A fertőzött sejteket immunfluoreszcens (IF) festéssel detektáltuk a fertőzés 22. órájában. A kimutatáshoz 3C9 (ATCC CRL-1745) monoklonális anti-PPV kapszid ellenanyagot és CF488A-jelölt anti-egér másodlagos ellenanyagot használtunk. Egy módosított VN teszt során K22 és NADL-2 alapú vakcinákkal immunizált állatok savójából készítettünk felező hígítást, amelyeket 100-100 FFU (fluorescens focus unit) mennyiségű PPV 27a vagy K22 vakcina törzsszel inkubáltunk. Egy óra elteltével a vírus-ellenanyag tartalmú oldatot PT sejtekre mértük. A sejteket 22 óra múlva fixáltuk és a fertőzött sejteket IF festéssel detektáltuk. Az eredeti vírusmintákból DNáz kezelés után virális DNS-t tisztítottunk, majd qPCR segítségével meghatároztuk a vírusok kópiaszámát. A K22 vakcinatörzs titere PT sejteken nagyjából 8,3× volt magasabb, mint a 27a stocké, míg PK15 sejteken a K22 stock titere közel 12× volt magasabb (az NADL-2 titere PT sejteken 200×-osa volt a K22 stocknak, míg PK15 sejteken 130×-osa). A qPCR adatok alapján viszont a K22 stockja nagyjából 5,5× több kópiát is tartalmazott egységnyi térfogatban mint a 27a stock. A VN teszt során, mind a két vakcinatörzsszel immunizált állatok savói esetében, a PPV 27a törzsszel szemben alacsonyabb volt az ellenanyagok neutralizációs titere. Az átlagos eltérés alapján az immunizált állatok savóját nagyjából 2,5× töményebben kellett használni a PPV 27a törzs neutralizációjához mint a K22 vakcinatörzs ellen.

A titrálási és qPCR adatok alapján a PT sejteken a 100 FFU mennyiségű PPV 27a minta ~1,5× több víruskópiát tartalmazott, mint 100 FFU K22 minta. A vírusneutralizációs teszt során azt tapasztaltuk, hogy az 1,5× több viriont nagyjából 2,5× (SD±2,01) töményebben (magasabb ellenanyag tartalmú) savó neutralizálta. Ez alapján a két vírus törzs neutralizációs titere között nincs szignifikáns különbség. Adataink nem támasztják alá, hogy a vakcinázás során keletkező anti-PPV ellenanyagok neutralizáló képessége gyengébb lenne a 27a törzs ellen mint a K22 törzs ellen, ami kérdéseket vett fel a 27a-ra vonatkozó korábbi vizsgálatok ez irányú eredményeivel kapcsolatban is.

## AZ AFRIKAI SERTÉSPESTIS VÍRUS VP72 FŐ BUROKFEHÉRJE IMMUNHISZTOKÉMIAI MÓDSZERREL TÖRTÉNŐ KIMUTATÁSA TERMÉSZETES KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT FERTŐZÖDÖTT VADDISZNÓBAN

Szeredi Levente\*, Bálint Ádám, Bakcsa Erika, Szajkiné dr. Szalay Dóra, Erdélyi Károly

Az afrikai sertéspestis (asp) első magyarországi előfordulása 2018-ban került bejelentésre vaddisznóban. Azóta a fertőzött területek nagysága hazánkban lassan, de folyamatosan nő. Az elhullott állatokban a vírus kimutatásának legmegbízhatóbb módszere a RT-PCR, amellyel a kórokozó már a fertőzés egészen korai szakaszában detektálható, és a betegség valamennyi klinikai formájában (túlheveny, heveny, félheveny, krónikus, szubklinikai) megbízható eredményt nyújt. Nagy érzékenységének köszönhetően a legkülönbözőbb, akár erősen autolizált minták (szervek, vér, szérum) vizsgálatára is alkalmas. Az antigén alapú kimutatási módszerek (IF, ELISA, IH) ugyancsak jól alkalmazható laboratóriumi eljárások azzal a megszorítással, hogy azok csupán a túlheveny, heveny és egyes félheveny formáknál nyújtanak megbízható eredményt.

A vizsgálatok célja az volt, hogy kidolgozásra kerüljön egy olyan immunhisztokémiai (IH) módszer, amely kiegészítő eljárás-ként használható az asp laboratóriumi diagnosztikájában.

Egy elhullva talált és egy kilőtt, az RT-PCR módszerrel asp pozitívnak bizonyult, vaddisznóból vett szervminták 10%-os formalin oldatban kerültek fixálásra. A szervmintákból készített paraffinos sorozat metszeteket hematoxillin-eozin festést és IH festést követően vizsgálták. Az IH teszt során a kereskedelmi forgalomba kapható, az asp vp72 fő burokfehérje ellen termelt monoklonális ellenanyagot, az ellenanyag kapcsolódásának kimutatására pedig ugyancsak kereskedelmi forgalomban kapható, felhasználásra kész, polimer alapú reagenst és kromogént alkalmaztak.

A kórszövet-tani vizsgálattal az elhullott állatban az előrehaladott önmészttetségen kívül egyéb kórjelző értékű elváltozást nem találtak. Ezen állat mindkét vizsgált szervében (vese, lép) az asp vp72 fehérjét sejten kívül, apró rögök formájában továbbá számos sejt citoplazmájában és/vagy magjában kisebb-nagyobb rögök alakjában lehetett kimutatni. A kilőtt vaddisznó esetében a kezdődő önmészttetség mellett a heveny, ill. félheveny asp-re jellemző elváltozások fordultak elő (számos szervben vasculitis és vérere-fajulás továbbá frisskeletű, enyhébb-súlyosabb fokú vérzés, enyhe-közepes fokú gyulladással sejtes infiltráció és e gyulladással sejtek rhexise, a lymphoid szervekben kiterjedt rhexis és lymphoid depletio, tubulonephrosis). Az asp vp72 fehérjét valamennyi vizsgált szerv esetében (agy, tüdő, szív, máj, lép, vesze, nyirokcsomó, gyomor) számos sejt citoplazmájában és/vagy magjában kisebb-nagyobb rögök alakjában lehetett kimutatni. A szétesett sejtek területén a vírusfehérje sejten kívül, apró rögök alakjában is megfigyelhető volt.

A bemutatott IH módszer segítségével sikerült detektálni az asp előfordulását vaddisznóban. A módszer alkalmasnak mutatkozott mind a túlheveny, mind pedig a heveny-félheveny asp következtében elhullott vaddisznók esetében, sőt azok előrehaldottan önmészttett szerveiben is a vírus kimutatására. A kidolgozott IH eljárás RT-PCR-hez viszonyított érzékenységének meghatározásához további összehasonlító vizsgálatok szükségesek.

## AZ AFRIKAI SERTÉSPÉSTIS VÍRUS POLICITIZIN ÉS POLIGUANIN SZAKASZAINAK VIZSGÁLATA

Tamás Vivien<sup>1\*</sup>, Olasz Ferenc<sup>1</sup>, Mészáros István<sup>1</sup>, Ursu Krisztina<sup>2</sup>, Zádori Zoltán<sup>1</sup>

Az afrikai sertéspestis vírus (ASPV) egy burkos, ikozaéderes vírus, melynek genomja 170-194 kb hosszú, kétszálú DNS. A genom két végén kovalensen zárt, fordítottan ismétlődő szekvenciák találhatók, míg a közepén egy viszonylag jól konzervált régió helyezkedik el (kb. 125 kb), a két szélén egy-egy variábilis régióval szegélyezve (38-47 és 13-16 kb), amelyek nagyrészt öt multigén családba (MGF- multigene family) sorolható fehérjéket kódolnak. Az ASPV bal oldali variábilis régiójában öt policitizin/guanin (C/G) szakasz található, amelyek közül három rendkívül variábilis C/G számot mutat a GenBankban található szekvenciák alapján. A három kérdéses szakasz közül egy az MGF 110-es, egy az MGF 360-as, egy pedig az MGF 300-as családhoz tartozó fehérjét kódoló génben található. A variabilitás oka jelenleg nem tisztázott, a szekvenálási ill. polimeráz-ejtette hibát sem zárhatjuk ki, de amennyiben a jelenség nem technikai eredetű, úgy a variancia szerepet játszhat az ORF-ek expresszáldásában és/vagy a vírus replikációjában.

A genom minél pontosabb ismerete és az ellentmondások feloldása vakcina fejlesztéshez, epidemiológiai vizsgálatokhoz, és a vírus alapvető biológiai tulajdonságainak megismeréséhez is segítséget nyújthat. Célunk a három fentebb említett variábilis C/G szakasz változatosságának vizsgálata három magyarországi ASPV mintában és szövettenyésztben passzált vírusokban. További céljaink közé tartozik a variabilitás okának felderítése, és olyan PCR és szekvenálási módszerek használata (fejlesztése), amelyek alkalmasak hosszú (>15) poly-C, poly-G szakaszok egyértelmű szekvencia meghatározására.

A vizsgálni kívánt szakaszok amplifikálására szekvenspecifikus primereket terveztünk a kérdéses poli C/G szakaszok köré. A PCR reakció után a terméket CloneJET PCR Cloning Kit (ThermoFisher Scientific) segítségével klónoztuk és OneShot DH10B kompetens sejtbe (ThermoFisher Scientific) transzformáltuk. A plazmidokat preparálás után PEG-el tisztítottuk. Tisztítás után a plazmidról újbóli PCR reakció segítségével amplifikáltuk a kérdéses szakaszokat, majd Nucleospin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) felhasználásával gélből izoláltuk őket. A plazmidokat és az ezekről PCR-el sokszorosított szakaszokat Sanger-módszerrel szekvenáltuk.

A különböző poli C/G régiókból 10 klónt szekvenáltunk. Eredményeink a poli C/G számot illetően nagy szórást mutatnak, 10 és 18 polinukleotid szám között változnak. Annak ellenőrzésére, hogy a variabilitás nem technikai eredetű (PCR vagy szekvenálás), High Fidelity enzim segítségével a klónokról is amplifikáltuk a kérdéses szakaszokat, majd ezeket a szakaszokat is szekvenáltuk. Míg a kevesebb számú polinukleotidot tartalmazó szakaszoknál a plazmid és az utána készített PCR reakció utáni szakaszok polinukleotid száma megegyezett, úgy a magasabb számú polinukleotidot tartalmazó klónok és a PCR termék polinukleotid száma között jelentős eltérést tapasztaltunk.

Eredményeink alapján megkérdőjelezhetjük a polinukleotid szakaszokra eddig használt PCR protokollok megbízhatóságát, illetve azt, hogy a konvencionális módszerek alkalmasak-e a magasabb nukleotidszámú polinukleotid régiók pontos amplifikálására. Ez alapján felmerül a kérdés, hogy az eddig közzétett ASPV szekvenciák mennyire pontosak ezekben a régiókban.

A kutatást a K119381-es számú pályázat támogatta.

## AZ AFRIKAI SERTÉSPÉSTIS VÍRUS VIZSGÁLATA SERTÉS PULMONÁLIS MACROPHÁGOKBAN

Tamás Vivien<sup>1</sup>, Mészáros István<sup>1\*</sup>, Olasz Ferenc<sup>1</sup>, Hornyák Ákos<sup>1</sup>, Magyar Tibor<sup>1</sup>, Zádori Zoltán<sup>1</sup>

Az *Asfarviridae* családba tartozó afrikai sertéspéstitis vírus (ASPV) molekuláris biológiájáról származó ismereteink túlnyomó többsége fajidegen, immortalizált sejtvonalon végzett kísérletekből származik. Ennek oka a fertőzés elsődleges célsejtjeinek számító pulmonális macrophagokkal (PAM) való munka körülményessége, az eredmények nehéz reprodukálhatósága, valamint a PAM sejtek költséges izolálása; ezek elriasztják a kutatókat a használatuktól. A vírus vizsgálatához mindenképpen hasznos lenne egy, az *in vivo* fertőzéshez közelebb álló, megbízhatóan reprodukálható kísérleti rendszer felállítása.

Egy sertés PAM alapú, megfelelően reprodukálható kísérleti rendszer létrehozása és jellemzése az ASPV vizsgálatához.

A sertés eredetű PAM sejteket RPMI médiumban, 10% BSA, 1% Na-piruvát, 1% antibiotikum/antimycotikum és 1% nem esszenciális aminosavak jelenlétében, 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> szinten növesztettük. A sejteket az ASFV\_HU\_2018 törzssel fertőztük, a fertőzést immunofluoreszcens festéssel mutattuk ki, ASPV+ savó, vagy anti-p72 elsődleges ellenanyag használatával. A sejteket ImageJ programmal számoltuk le, három párhuzamos fertőzésből származó kép használatával. A PAM sejteket ugyanabból az állatból származó, fagyasztott-felolvasztott (sérült) vörösvértestek (vvt) vagy *E. coli* baktériumok hozzáadásával aktiváltuk. A vírus bejutási útvonalának vizsgálatához, az endocitózis különböző formáit gátló kémiai anyagokat (lipopoliszacharid, klórpromazin-hidroklorid, mono-danzil-kadaverin, 5-N-etil-N-izopropil amilorid, citokalazin D, latrunculin B, polyinosinic sav) használtunk. Kontrol vizsgálatként a kísérleteket a részletesen jellemzett bejutási útvonalú sertés légzőszervi és reprodukciós szindróma vírussal (PRRS) fertőzött macrophagokon is elvégeztük.

Vizsgálataink során a PAM sejteket ért bármilyen külső (stressz)hatás befolyásolta az ASPV-vel való fertőzhetőségüket. Annak ellenére, hogy a fertőzés 72. órájára az összes sejt elpusztult, a 24. órában, még magas multiplicitású (MOI: 10) fertőzés esetén is a sejteknek csak 10-30%-ában volt IF festéssel detektálható a vírus. Ezt befolyásolta, hogy mekkora volt a sejtek sűrűsége, mely állatból származtak, illetve hogy szélesztés után mennyi idővel történt a fertőzés. A fagyasztásból felvett sejtek közvetlenül a szélesztés után voltak a legkevésbé, míg 24 órával a szélesztés után a leginkább érzékenyek a fertőzésre. Ha a macrophagokat vvt vagy baktériumok hozzáadásával aktiváltuk, az ASPV-vel való fertőzhetőségük drámaian lecsökkent. Az összes vizsgált endocitózis gátló szer képes volt legalább részlegesen gátolni a fertőzést, ami kérdéssé teszi ezen anyagok megfelelő specifitását.

A PAM sejteknek csak egy része fogékony a fertőzésre *in vitro*. Az arány feltehetően függ az állatok és a macrophagok aktuális (immun)állapotától, a sejteket ért stresszhatásoktól. Fertőzhetőségük rövid idő alatt képes megváltozni, ami arra utal, hogy nem egy sejtfelszíni receptormolekula megjelenése/eltűnése felelős ezért. Azonban a stresszhatások minimalizálásával és sztenderd fertőzési körülmények alkalmazásával az ASPV fertőzés megfelelően reprodukálható. Valamennyi endocitózis gátló anyag legalább részlegesen képes volt blokkolni a fertőzést, ami – a PRRSV-vel végzett kontroll kísérletek és a vonatkozó szakirodalom alapján is – azt mutatja, hogy hatásuk nem kellően specifikus ahhoz, hogy rájuk támaszkodva következtethessünk a vírus bejutási útvonalára, és kérdéseket vet fel a korábbi kísérletek érvényességével kapcsolatban is.

A kutatást a K119381-es számú pályázat támogatta.

## ROTAVÍRUS NSP1 GÉNEK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA AZ INTERFERON TERMELÉSRE SEJTKULTÚRÁBAN

Varga-Kugler Renáta\*, Nagy Borbála Ágnes, Kaszab Eszter, Forró Barbara, Bányai Krisztián

A különböző rotavírus specieszek (RVA-RVJ) evolúciójuk során számos, egymást komplementáló mechanizmust fejleszthettek ki a gazdaszervezet immunválaszadó képességének gátlására. A RVA törzsek egyik legfontosabb eszköze ebben a küzdelemben az NSP1 fehérje. Az RVA NSP1 egy E3 ubiquitin ligáz, mely a patogén mintázat felismerésének szintjétől kezdve, az interferon (IFN) kaszkád szignálfolyamatainak intermedierjein át a transzkripció szintjéig képes gátolni a sejt vírusszaporodással interferáló mechanizmusait. A RVB-RVJ (azaz non-RVA) törzsek esetében az NSP1-szerű géntermékek szekvenciái a RVA NSP1 fehérjéjétől akár 90%-ban is eltérhetnek; ezek funkciójára vonatkozóan hiányoznak az ismeretek.

Vizsgálataink célja az volt, hogy meghatározzuk a non-RVA törzsek NSP1-szerű fehérjéinek lehetséges szerepét a sejt IFN termelésének gátlásában.

Laboratóriumunkban azonosított non-RVA törzsek NSP1-génjét amplifikáltuk, majd eukarióta expressziós vektorba (pcDNA3) klónoztuk. Az IFN indukciójához poly I:C molekulát használtunk. Az IFN transzkripció mértékét részben fajidegen (csirke, sertés, macska), részben fajazonos (kutya) epithel jellegű (CRFK, MDCK, PK15, LMH) és fibroblaszt (A72) sejtvonalakban mértük transzfekciót követően, faj-specifikus TaqMan assay segítségével.

A CRFK és LMH sejtekben nem figyeltünk meg poly I:C által kiváltott IFN termelést, az MDCK és PK15 sejtekben volt ugyan IFN indukció, de a vizsgált rotavírus NSP1 gének nem okoztak csökkenést az IFN gén kifejeződésében. A kutya eredetű A72 sejtvonalon a fajidegen (denevérből kimutatott) RVJ NSP1 40%, a fajazonos (kutyaéból kimutatott) RVC és RVI NSP1 36% illetve 83% csökkenést idézett elő az IFN gén transzkripciójában.

A RVA NSP1 génen alapuló szakirodalmi adatok alapján jelentős IFN redukciót vártunk. Az általunk vizsgált non-RVA NSP1 gének azonban jóval kisebb mértékű csökkenést idéztek elő az IFN gén transzkripciójában. Az eltérés mögött több magyarázat is lehetséges. Az alkalmazott kísérleti rendszerek eltérőek voltak és elképzelhető, hogy az itt használt sejtípusok, azok eltérő gazda- és szervi eredete miatt kevésbé voltak alkalmasak a célkitűzésekben feltett kérdések megválaszolására. Lehetséges továbbá, hogy a non-RVA törzsek egy részénél az NSP1 fehérje nem ugyanazt a feladatot látja el, mint az RVA törzseké, vagy ha mégis, akkor a folyamat hatékonyságában lehetnek jelentős eltérések.

A kutatómunka anyagi fedezetét a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal KH126521 számú pályázata biztosította.