

Vizibaromfi fajok mycoplasmosisai

Dr. Gyuranecz Miklós
Állatorvostudományi Kutatóintézet

Vízi baromfi patogén *Mycoplasma* fajok

Faj	Első leírás	Tápanyag igény	Gazdafaj	Hazai előfordulás	Kórkép
<i>M. anserisalpingitidis</i>	Stipkovits, 1984	Glükózt fermentál	Liba (kacsa)	Nagyon gyakori	phallus, kloáka, petevezető, légzsák gyulladás, embrió mortalitás, here sorvadás, degenerált tüszők, kötőhártya gyulladás, agyvelőgyulladás
<i>M. anatis</i>	Roberts, 1976	Glükózt fermentál	Kacsa (liba)	Közepes/ Ritka	Légzsákgyulladás, idegrendszeri tünetek, agyvelő, agyhártya gyulladás, embrió mortalitás
<i>M. anseris</i>	Stipkovits, 1984	Arginint hidrolizál	Liba	Gyakori	phallus gyulladás, embrió mortalitás, hashártya és légzsák gyulladás
<i>M. cloacale</i>	Bradbury, 1984	Arginint hidrolizál	Liba, kacsa (pulyka, stb.)	Gyakori	Kommenzalista?
<i>Acholeplasma</i> fajok	1940-es évek		Liba és számos egyéb állatfaj	Közepes	Embrió mortalitás légzsák és savóshártya gyulladás

Kóroktan: *M. sp. 1220* – *M. anserisalpingitidis* fajleírás

INTERNATIONAL
JOURNAL OF **SYSTEMATIC
AND EVOLUTIONARY
MICROBIOLOGY**

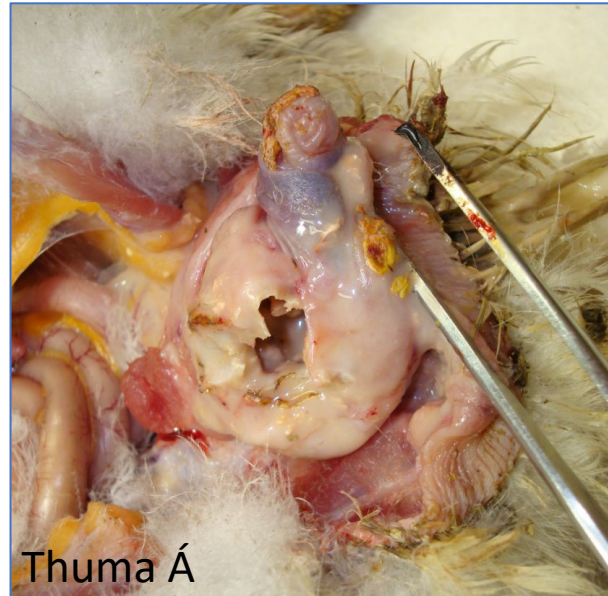
TAXONOMIC DESCRIPTION

Volokhov *et al.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
DOI 10.1099/ijsem.0.004052



Mycoplasma anserisalpingitidis sp. nov., isolated from European domestic geese (*Anser anser domesticus*) with reproductive pathology

Dmitriy V. Volokhov^{1,*}, †, Dénes Gróznér^{2,3} †, Miklós Gyuranecz^{2,3} †, Naola Ferguson-Noel⁴, Yamei Gao¹, Janet M. Bradbury⁵, Paul Whittaker⁶ †, Vladimir E. Chizhikov¹ §, Susan Szathmary^{7,8} and Laszlo Stipkovits⁸ †



Kóroktan: Fajok teljes genomjainak meghatározása és összehasonlítása (Grózner és mtsai., 2018&2019)

- Törzsek:**

M. anserisalpingitidis ATCC BAA-2147,
MYCAV 93 és MYCAV 177 klinikai izolátumok

M. anatis NCTC 10156

M. anseris ATCC 49234

M. cloacale NCTC 10199

- Szekvenálás:**

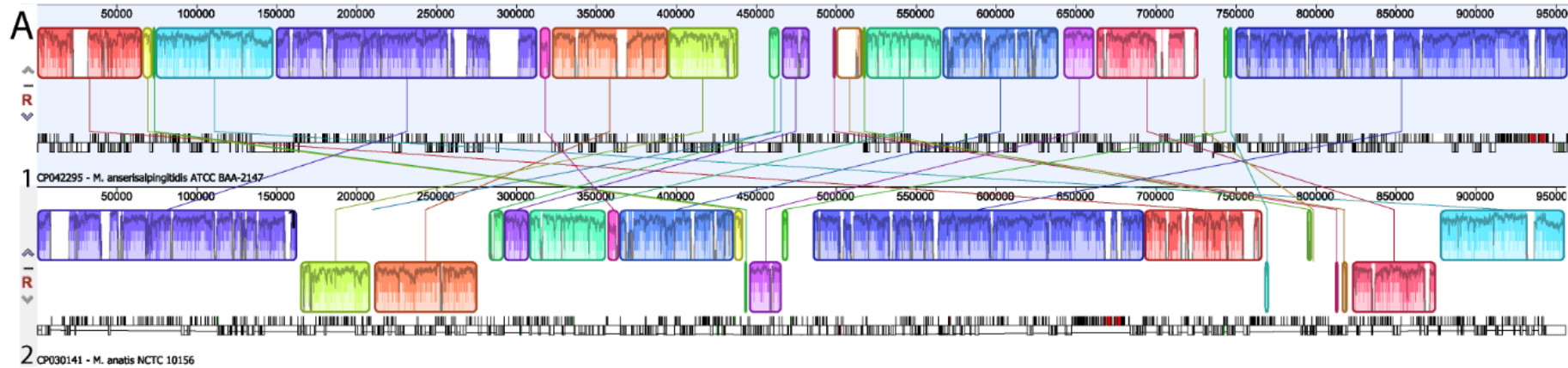
Illumina NextSeq500 NGS / MiSeq

Törzs	Méret (bp)	GC-tartalom (%)	CDS	GenBank azonosító
<i>M. anserisalpingitidis</i> ATCC BAA-2147	959.110	26,7	774	CP042295
<i>M. anserisalpingitidis</i> MYCAV 93	919.993	26,7	730	CP041663
<i>M. anserisalpingitidis</i> MYCAV 177	908.787	26,7	742	CP041664
<i>M. anatis</i> NCTC 10156	956.094	26,7	791	CP030141
<i>M. anseris</i> ATCC 49234	750.009	26,4	617	CP030140
<i>M. cloacale</i> NCTC 10199	659.552	27,0	541	CP030103

Annotált gének szerepe	<i>M. anserisalpingitidis</i> ATCC BAA-2147 (%)	<i>M. anatis</i> NCTC 10156 (%)	<i>M. anseris</i> ATCC 49234 (%)	<i>M. cloacale</i> NCTC 10199 (%)
aminosav metabolizmus	2	2	5	6
szénhidrát metabolizmus	17	15	8	8

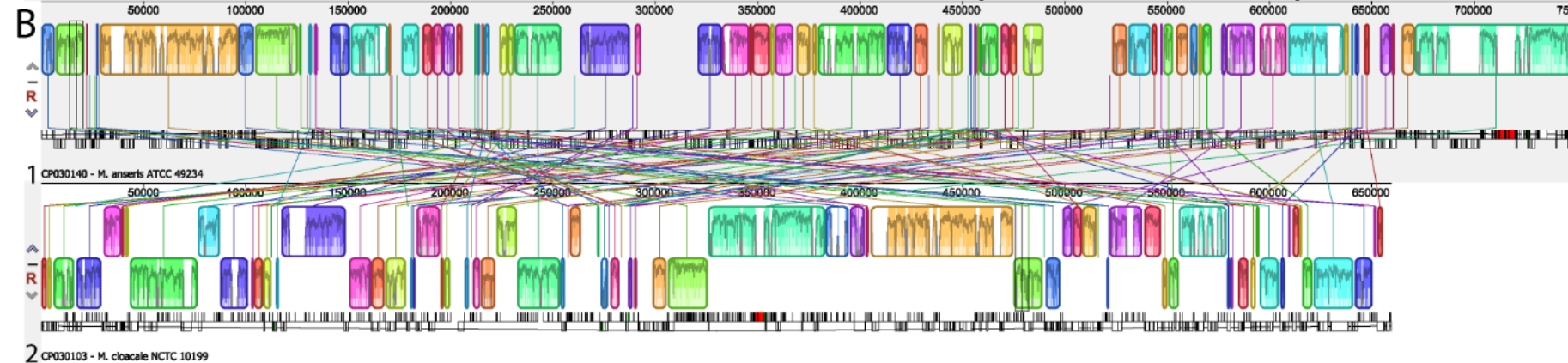
Kóroktan: Fajok teljes genomjainak meghatározása és összehasonlítása (Grózner és mtsai., 2018&2019)

M. anserisalpingitidis ATCC BAA-2147 és *M. anatis* NCTC 10156 (MAUVE illesztés)



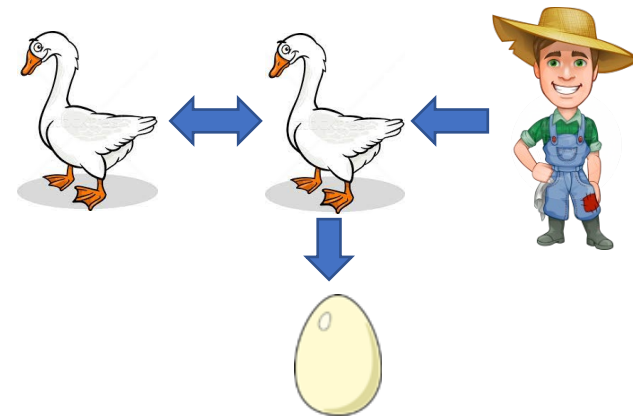
27 lokálisan kollineáris blokk, leghosszabb blokk 237 kbp

M. anseris ATCC 49234 és *M. cloacale* NCTC 10199 (MAUVE illesztés)



84 lokálisan kollineáris blokk, leghosszabb blokk 92 kbp

Járványtan, kórfejlődés



- Világszerte elterjedt kórokozók?
- Tünetmentes állatokból is kimutathatóak
- Törzsek patogenitása, virulenciája valószínűleg eltérő
- Klinikai tünetek megjelenéséhez hajlamosító tényezők hozzájárulhatnak:
 - Stressz (szaporodási időszak)
 - Nagyüzemi, intenzív tartásmód
- Vertikálisan (sperma, tojás) és horizontálisan (termékenyítés, bélsár) is terjednek

Mycoplasma anserisalpingitis első izolálása kínai hattyúlúdból (Gyuranecz és mtsai., 2020)

- Liba tenyésztés – világ (2 520 000 t):
 - Európa: prémium termék
 - Ázsia: tömeg termék
 - Kína:
 - 2 420 000 t, világtermelés 95%-a
 - Nem volt szakirodalmi adat a mycoplasmosis előfordulásáról



Expedíció Kínába



Két lúd faj

Európa:
Anser anser



Kína:
Anser cygnoides cygnoides



Hefa Farm: 75 ezer törzsliba, kacsa tenyésztés hal tenyésztés, sertés tenyésztés



Klinikai tünetek – Kórbonctani elváltozások

1-2% feltételezhetően *Mycoplasma* okozta veszteség

Magyarország:

Anser anser



Kína:

Anser cygnoides cygnoides





Mintavétel & minta feldolgozás
12 liba & 2 kacsa

Minta szállítás

Kanton → Nanking → Bangkok → Budapest



Eredmények

Azonosító	Faj	Ivar	Állapot	Kezelés	Izolálás	PCR
1A	liba	gúnár	beteg	kezelt	<i>M. cloacale</i>	-
2A	liba	gúnár	egészséges	kezelt	<i>M. cloacale</i>	<i>M. anserisalpingitis</i>
3A	liba	gúnár	beteg	kezelt	<i>ismeretlen Mycoplasma sp.</i>	-
4A	liba	gúnár	beteg	kezelt	-	-
5A	liba	gúnár	beteg	kezelt	<i>M. cloacale</i>	<i>M. anserisalpingitis</i>
6A	liba	gúnár	beteg	kezelt	-	-
7A	liba	gúnár	beteg	kezelt	<i>M. cloacale</i>	<i>M. anserisalpingitis</i>
8A	liba	gúnár	beteg	kezelt	-	-
9A	liba	tojó	beteg	kezelt	<i>M. anserisalpingitis</i>	<i>M. anserisalpingitis</i>
10A	liba	tojó	beteg	kezelt	-	-
11A	liba	tojó	egészséges	nem kezelt	<i>M. anserisalpingitis</i>	-
12A	liba	tojó	egészséges	nem kezelt	<i>M. anserisalpingitis</i>	<i>M. anserisalpingitis</i>
D1	kacsa	tojó	egészséges	nem kezelt	<i>Acholeplasma</i>	-
D2	kacsa	tojó	egészséges	nem kezelt	-	-

M. anserisalpinitidis előfordulása vadmadarakban (Sawicka és mtsai., 2022)

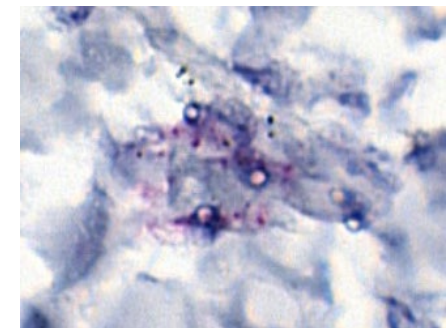


0.02

- Pulawy, Lengyelország
- AI monitoring során gyűjtött tamponok

Diagnosztikai módszerek

- Indirekt módszerek – szerológia:
 - Kereskedelmi forgalomban kapható kit jelenleg nem áll rendelkezésre
 - Csak in-house tesztek kutatási célra
- Direkt módszerek:
 - Megfelelő minta:
 - Phallus lymphá
 - Kloáka tampon
 - Sperma (krioprezervációt túlélnek, Végi és mtsai., 2021)
 - Petevezető
 - Légzsák
 - PCR
 - Izolálás
 - *In-situ* hibridizáció (Gróznér és mtsai., 2022b)
- Genotipizálás: törzsek összehasonlítása, járványtani nyomozás



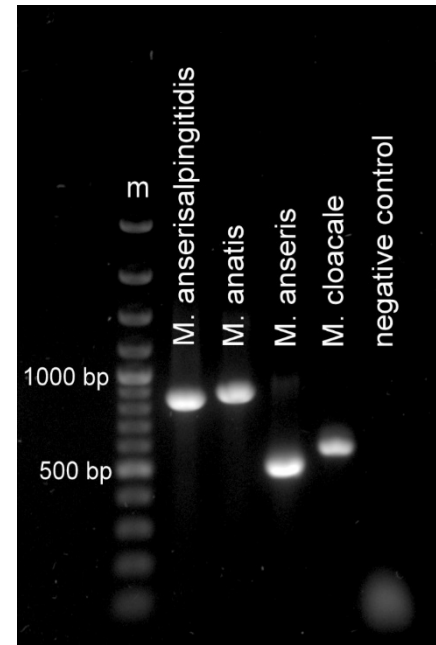
Faj-specifikus konvencionális PCR &

(Grózner és mtsai., 2019)

<i>Mycoplasma</i>	Gén	Primer pár tesztelés
<i>M. anserisalpingitidis</i>	3	7
<i>M. anatis</i>	4	4
<i>M. anseris</i>	3	3
<i>M. cloacale</i>	2	3

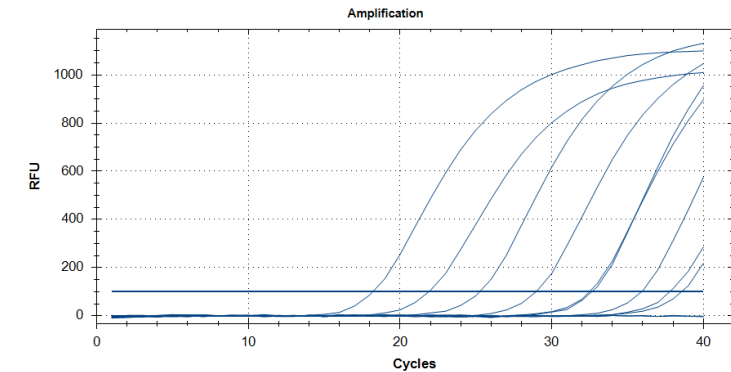


<i>Mycoplasma</i>	Gén	Primer szekvencia	Termék méret (bp)	Érzékenység (DNS templát)
<i>M. anserisalpingitidis</i>	<i>rpoB</i>	CCGTGATACTGCTCAATTCGAA TAGAAGTATAAACATCATCCTTAACAAGCT	857	10 ²
<i>M. anatis</i>	<i>dnaX</i>	CAGAGATCAGTCTGTTTTAGAATTACTTT TTTCTCAGATGCTTGTGAAATACAACCTT	895	10 ²
<i>M. anseris</i>	<i>pcrA</i>	CTAAAACTCCTAAAGACTTAGAAGAATC ATCCTCACCTTCATCATTTTTCTGTATA	504	10 ¹
<i>M. cloacale</i>	<i>dnaX</i>	TTCATCCGATAAGTTAAACCTTGTT AAAACCTGCTTTTGTATTTTTAGAATATAGT	591	10 ²



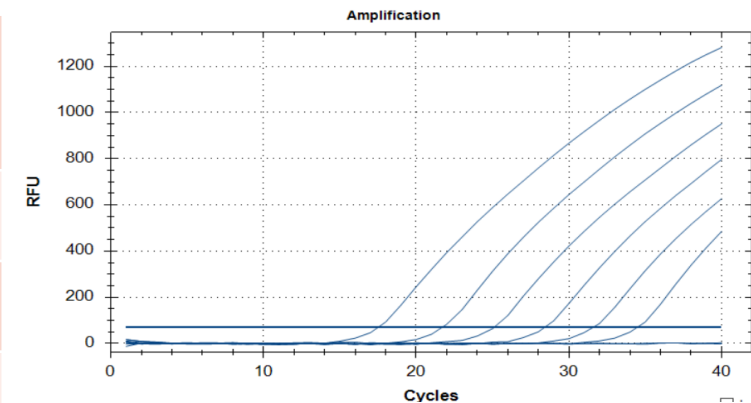
real-time PCR

(Nemesházi és mtsai., 2022)



M. anatis qPCR

Érz: 10¹



M. anserisalpingitidis qPCR

Érz: 10¹

Azononos hőprofil → egyidejűleg futtathatóak

M. anserisalpinitidis
MLST
(Grözner és mtsai., 2021)



Lengyelo.: 9 ST

Vietnám: 1 ST

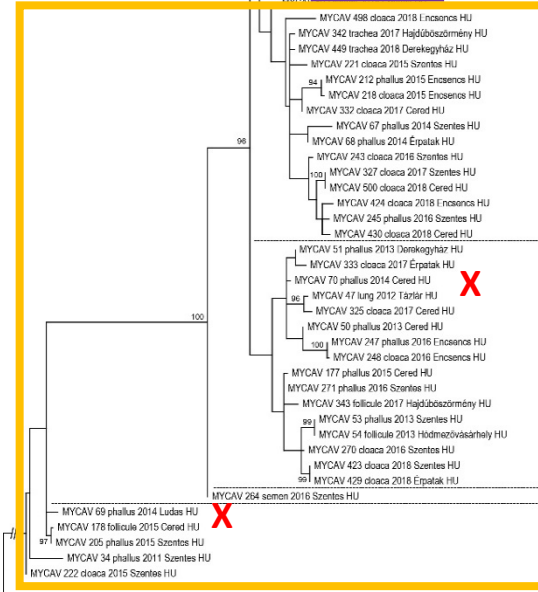
Kína: 2 ST

Ukrajna: 1 ST

Egy integráció mintái:
36 minta, 33 ST

X nem az integrációból származó minta

Magyaro.:
63 ST



M. anatis outgroup

M. anserisalpinitidis
cgMLST
(Kovács és mtsai., 2019)



I.
II.

91

Védekezési lehetőségek

Rövid távú

- Antibiotikumos gyógykezelés: Nehezebb gyógykezelné, mint az egyéb *Mycoplasma* fertőzéseket, széles körű rezisztencia

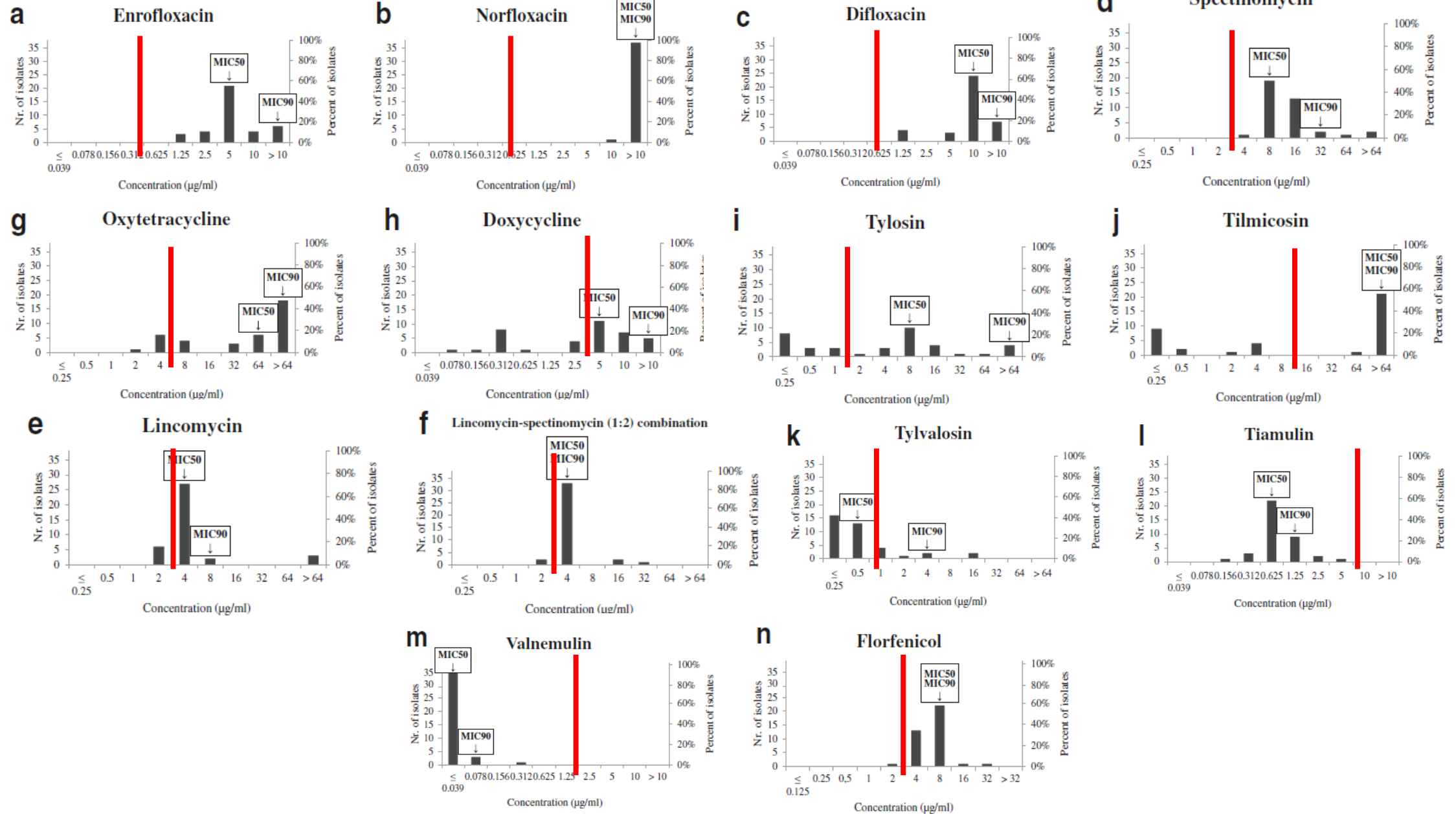
Leghatékonyabb AB-ok:
tiamulin, tilvalozin, doxiciklin

Hosszú távú

- Mentés törzsállományok:
 - Nehezen megvalósítható a tartástechnológia miatt
- Vakcinázás: kereskedelmi forgalomban kapható vakcina nincs, csak autovakcinák

M. anserisalpingitidis törzsek antibiotikum érzékenysége (Grözner és mtsai., 2016)

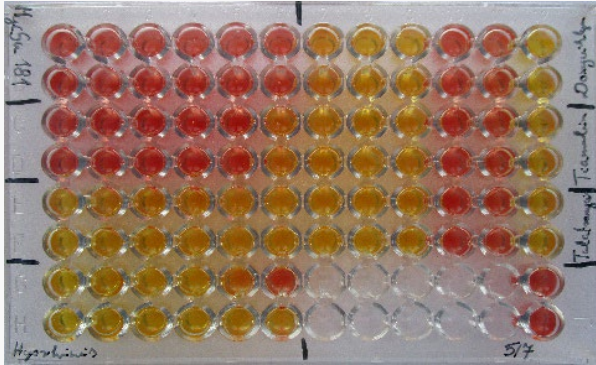
40 hazai, 2011-2015-ben gyűjtött izolátum



M. anserisalpingitidis makrolid & linkomicin érzékenységének meghatározása molekuláris biológiai módszerrel (Gróznér és mtsai., 2022a)

MIC meghatározás

- 82 magyar, lengyel, kínai, vietnámi izolátum



WGS

Tylosin	• 23S rRNA gén mutáció: 748 & 2058
Tilmicosin	
Tylvalosin	• L22 mutáció: 270
Lincomycin	

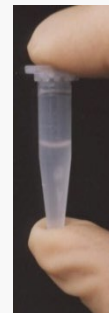
3 MAMA teszt

- ✓ Elkülöníti az alacsony és magas MIC értékkel rendelkező genotípusokat
- ✓ Közvetlenül a klinikai mintán is alkalmazható



DNS kivonás

2 óra

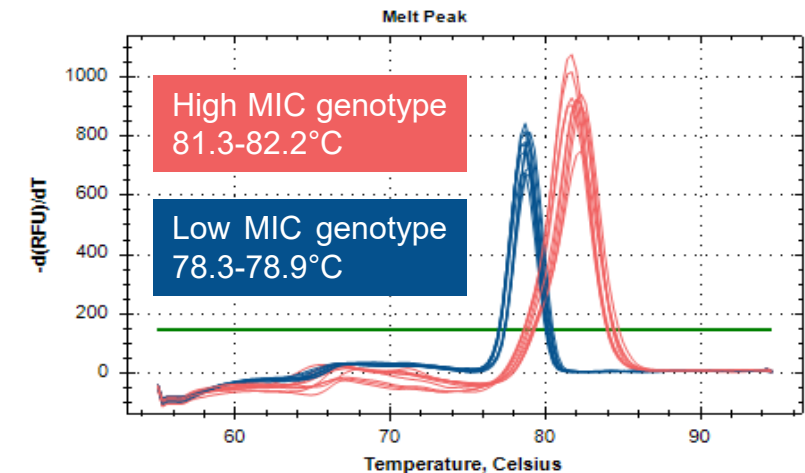


MAMA-PCR

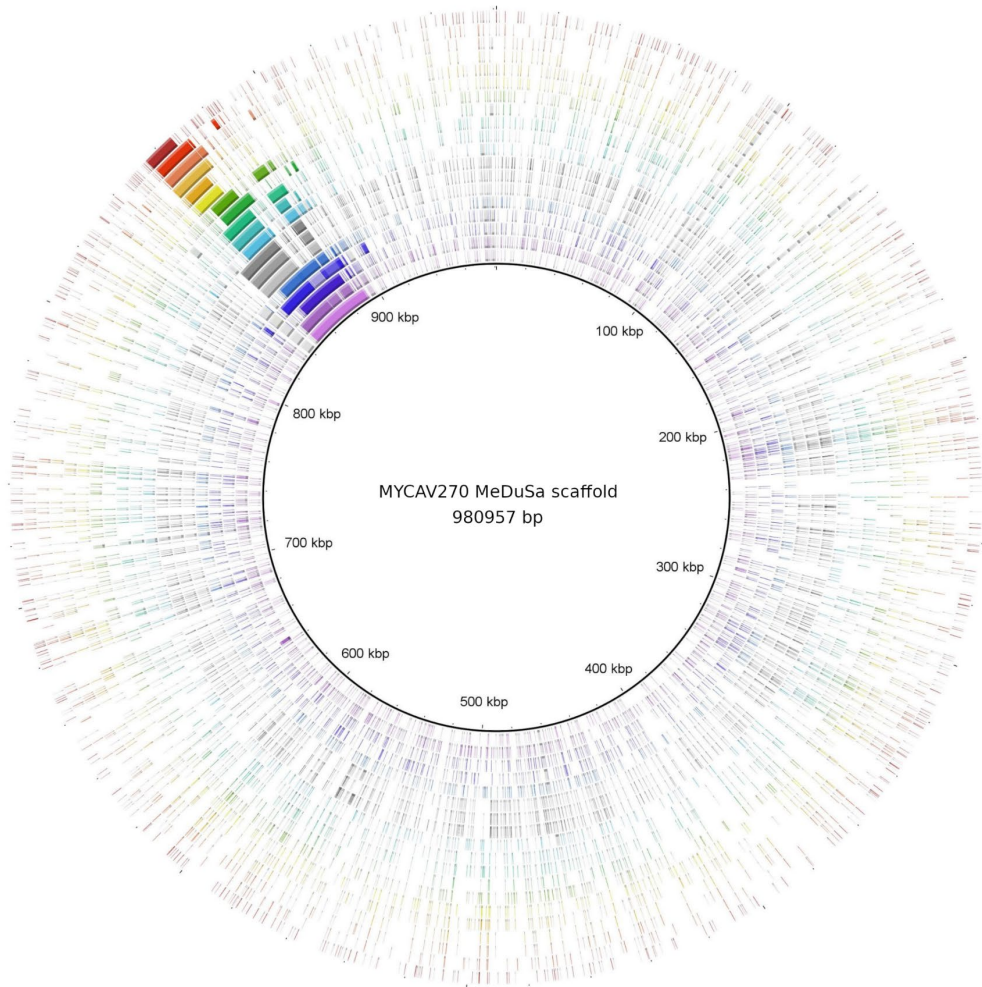
2 óra



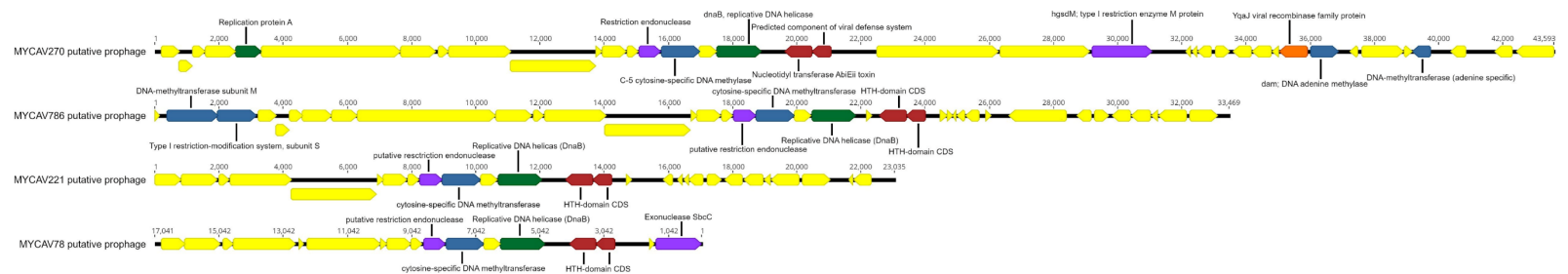
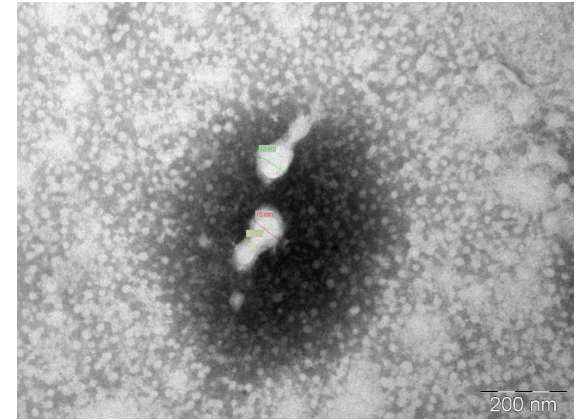
Makrolid és Linkomicin érzékenység vizsgálata akár 4 órán belül!



M. anserisalpingitidis fág vadászat (Kovács és mtsai., 2021)

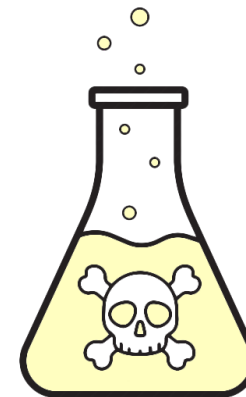


- | | |
|--|---|
| <p>MYCAV270 putative prophage</p> <ul style="list-style-type: none"> 100% identity 90% identity 80% identity | <p>MYCAV34 putative prophage</p> <ul style="list-style-type: none"> 100% identity 90% identity 80% identity |
| <p>MYCAV669 putative prophage-1</p> <ul style="list-style-type: none"> 100% identity 90% identity 80% identity | <p>MYCAV332 putative prophage</p> <ul style="list-style-type: none"> 100% identity 90% identity 80% identity |
| <p>MYCAV212 putative prophage</p> <ul style="list-style-type: none"> 100% identity 90% identity 80% identity | <p>MYCAV333 putative prophage</p> <ul style="list-style-type: none"> 100% identity 90% identity 80% identity |
| <p>MYCAV94 putative prophage</p> <ul style="list-style-type: none"> 100% identity 90% identity 80% identity | <p>MYCAV66 putative prophage</p> <ul style="list-style-type: none"> 100% identity 90% identity 80% identity |
| <p>MYCAV342 putative prophage-1, -2</p> <ul style="list-style-type: none"> 100% identity 90% identity 80% identity | <p>MYCAV68 putative prophage</p> <ul style="list-style-type: none"> 100% identity 90% identity 80% identity |
| <p>MYCAV786 (M. anatis) putative prophage-1</p> <ul style="list-style-type: none"> 100% identity 90% identity 80% identity | <p>MYCAV73 putative prophage</p> <ul style="list-style-type: none"> 100% identity 90% identity 80% identity |
| <p>MYCAV787 (M. anatis) putative prophage-1</p> <ul style="list-style-type: none"> 100% identity 90% identity 80% identity | <p>MYCAV78 putative prophage-2</p> <ul style="list-style-type: none"> 100% identity 90% identity 80% identity |
| <p>MYCAV788 (M. anatis) putative prophage-2</p> <ul style="list-style-type: none"> 100% identity 90% identity 80% identity | <p>MYCAV264 putative prophage</p> <ul style="list-style-type: none"> 100% identity 90% identity 80% identity |
| <p>MYCAV313 putative prophage-1, -2</p> <ul style="list-style-type: none"> 100% identity 90% identity 80% identity | <p>MYCAV666 putative prophage</p> <ul style="list-style-type: none"> 100% identity 90% identity 80% identity |
| <p>MYCAV221 putative prophage</p> <ul style="list-style-type: none"> 100% identity 90% identity 80% identity | |



M. anserisalpingitidis élő, attenuált vakcina törzs fejlesztése (Bekő és mtsai., 2021)

- N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) mutagenézis, az előállított klónok *in vitro* szelektálása
- 3 klón kolonizációs képességének vizsgálata állatkísérletben
- A vakcina jelölt klón („A klón” = MA271) horizontális terjedésének vizsgálata állatkísérletben
- MA271 ártalmatlanságának vizsgálata állatkísérletben (10× dózis)
- MA271 stabilitásának (revertálódó képesség) vizsgálata *in vitro* és *in vivo* állatkísérletben (10× passzálva)
- MA271 és szülői törzsének komplett WG szekvenálása, összehasonlítása és DIVA (vad-vakcina elkülönítő) teszt fejlesztése
- ELISA fejlesztés a szerológiai immunválasz monitorozására
- 30 000 dózis vakcina letermeltetése GMP körülmények között, engedélyek beszerzése a telepi kipróbáláshoz
- Két liba állományban a vakcina kipróbálása és nyomonkövetése két éven keresztül.
- Szabadalmi letétbe helyezés: DSMZ: DSM 33810
- Szabadalom: P 21 00357



	„A” klón	„B” klón	„C” klón
33 °C (CCU/ml)	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁸
39,5 °C (CCU/ml)	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵



A Zoonótikus Bakteriológia és Mycoplasmatológia Csoport (1143 Budapest, Hungária krt. 21.) kérelmére élelmiszerlánc-biztonsági hatósági jogkörben eljárva meghoztam az alábbi

HATÁROZATOT.

Az engedélyező hatóság az MA271 jelzésű készítmény gyakorlati kipróbálását az alábbiak szerint engedélyezi.

Vizsgálat célja:

MA271 jelzésű hőérzékeny *Mycoplasma anserisalpingitidis* vakcinajelölt hatékonyságának vizsgálata.

Állatházi kísérlet: ártalmatlanság & horizontális terjedés

- 8 db, 4 hetes: vakcina dózis
 10^7 CCU (50 μ l szem, 1 ml kloáka)
- 8 db, 4 hetes: 10 \times dózis
 10^8 CCU (50 μ l szem, 1 ml kloáka)

5
n
a
p

- 6 db kontakt madár
- 6 db kontakt madár

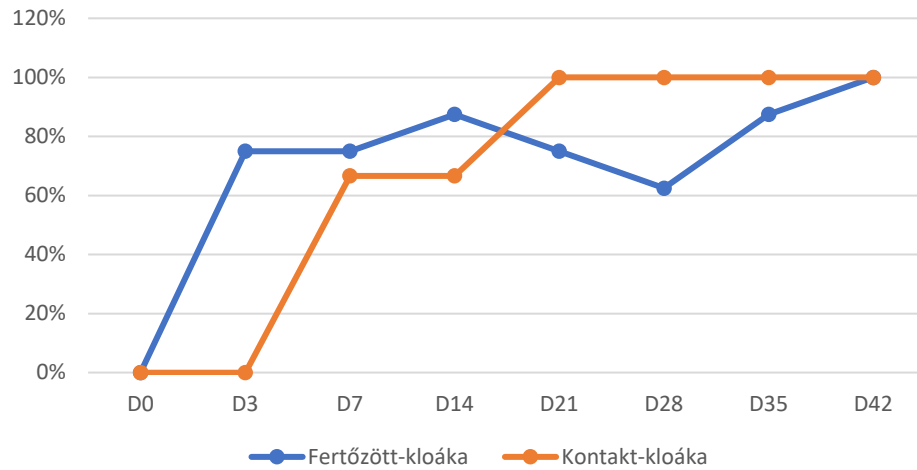
- Mintavétel
(kloáka&légcső tampon, vér):
0. 3. 7. 14. 21. 28. 35. 42. napokon

- 42. napon az állatok részletes
kórbonctani és laboratóriumi
vizsgálata

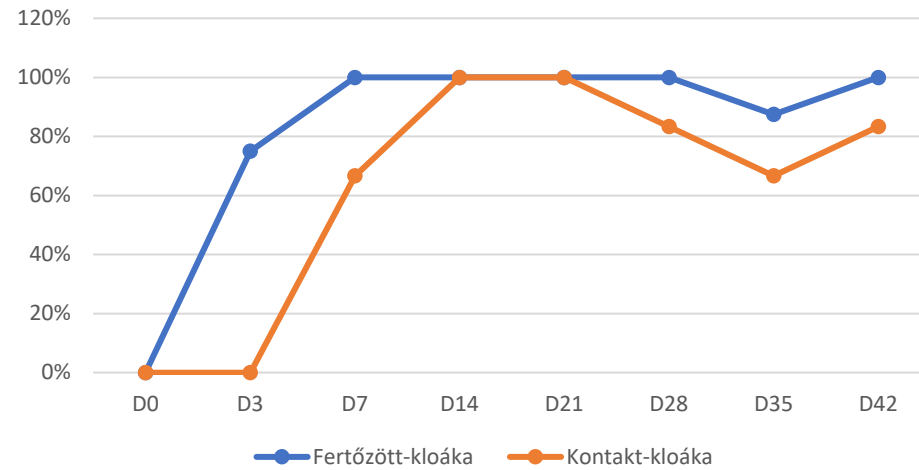


Állatházi kísérlet: ártalmatlanság & horizontális terjedés

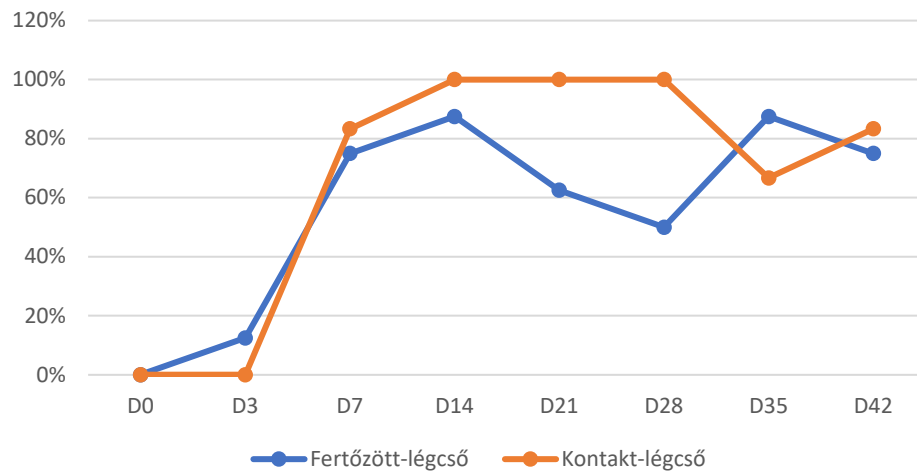
Kolonizáció: 10× dózis - kloáka



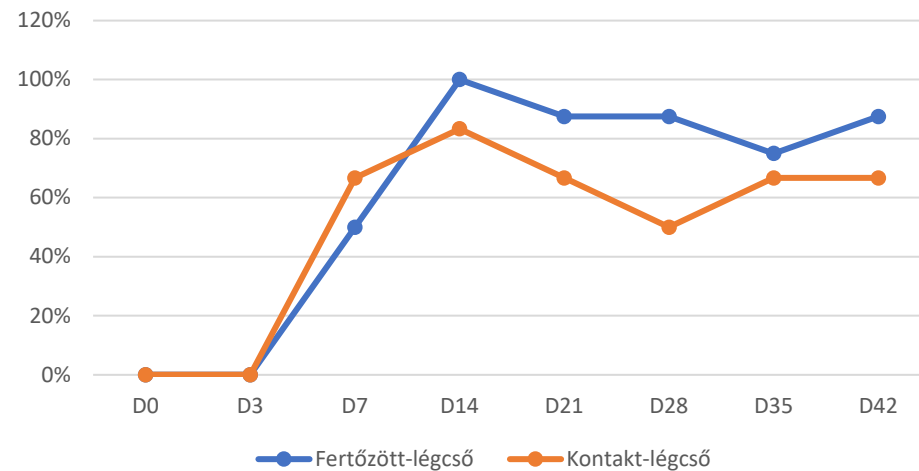
Kolonizáció: vakcina dózis - kloáka



Kolonizáció: 10× dózis - légcső



Kolonizáció: vakcina dózis - légcső



- Klinikai tüneteket nem észleltünk
- Fibrinpelyhek a légzsákokon, 2 állat légzsákja PCR pozitív

Telepi kísérlet:

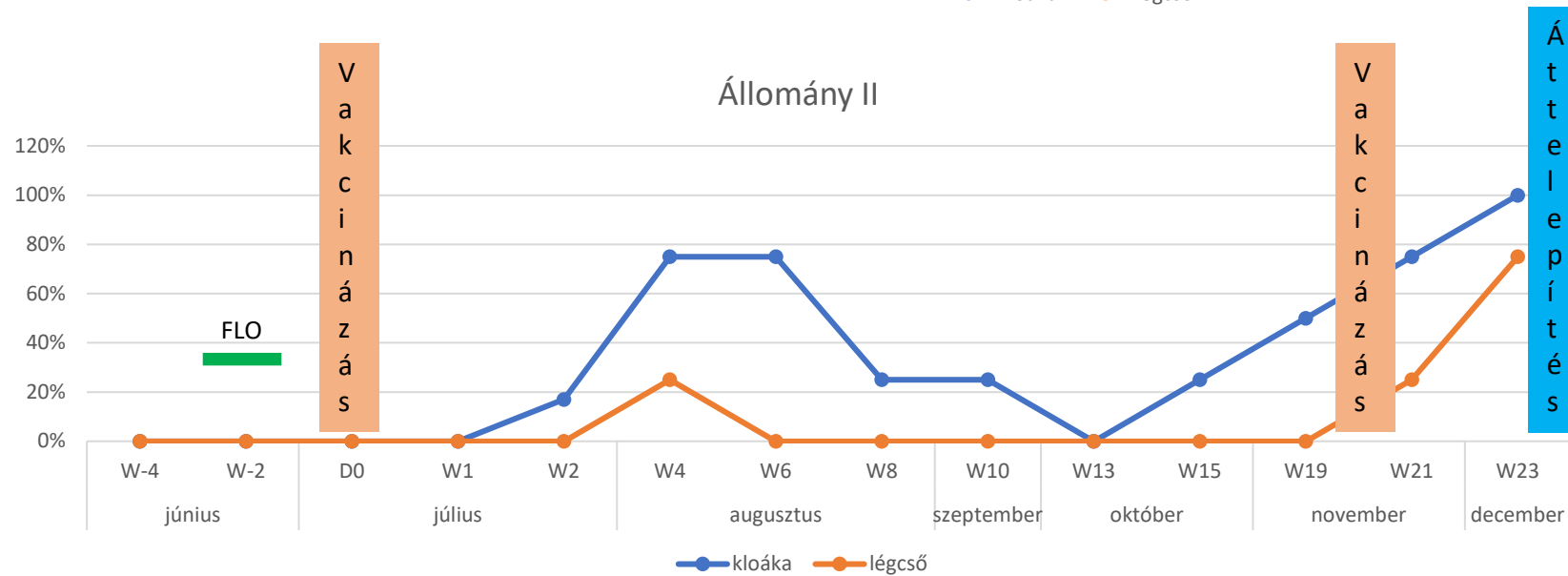
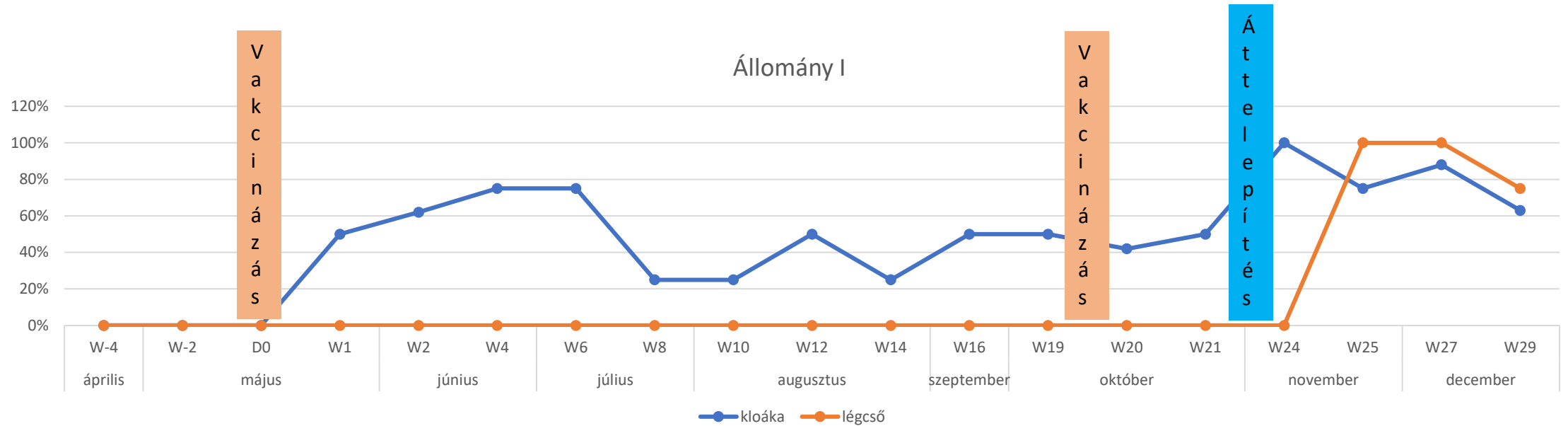
- Vakcinázás:
 - 4 hetes korban & 24 hetes korban
 - 10^7 CCU/ml
 - 50 μ l: szembe cseppentve,
1 ml: kloákába oltva
- Monitorozás:
 - Napos kortól
 - ~2 hetente
 - 20-60 madár: légcső & kloáka tampon
& vér: DIVA PCR, izolálás, (ELISA)





Telepi kísérlet

Telepi kísérlet: kolonizáció



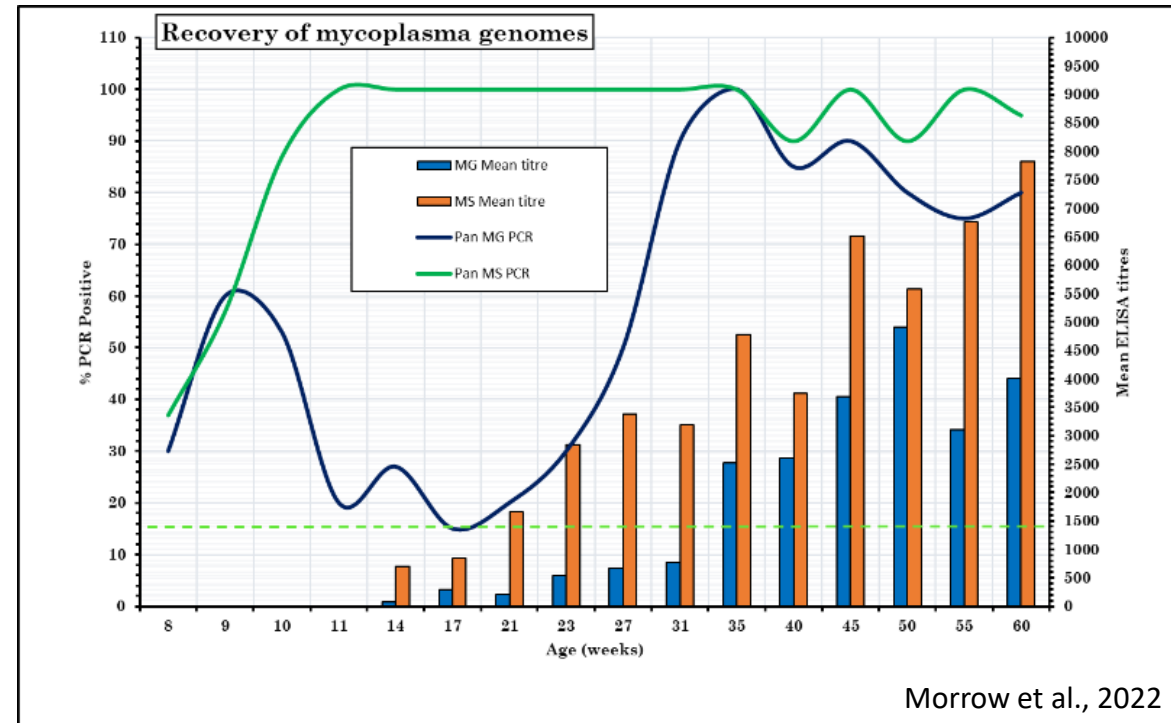
- Klinikai tünetek: nem volt
- DIVA PCR: csak vakcina
- Re-izolálás:
 - Állomány I: 94%
 - Állomány II: 20%

Telepi kísérlet: kolonizáció

- Kolonizáció dinamikája eltért az állatházi és telepi körülmények között
 - Állatház: *M. synoviae*-szerű dinamika
 - Telep: *M. gallisepticum*-szerű dinamika

- Oka?:

- Zsúfoltság mértéke
- Állatszoba ↔ Legelő
- Időjárás (meleg nyár, UV, őszi hűvös-nedves idő)



- Igazság pillanata: 2022 → Hogyan alakul a madarak első termelési ciklusa?

Telepi kísérlet: termelési ciklus - részeredmények

		január	február	március	április	május
Állomány I	Telep I	vad-vakcina	vad-vakcina	vad-vakcina	vad-vakcina	vad-vakcina
	Telep II	vad-vakcina	vad-vakcina	vad-vakcina	vad-vakcina	vad-vakcina
	Telep III	NV	NV	vakcina	NV	NV
Állomány II	Telep I	vad-vakcina	vad	vad	vad	vad
	Telep II	vad-vakcina	vad-vakcina	vakcina	vad-vakcina	vad-vakcina

Magyar nyelvű szakirodalom

141. / 495-504.

MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA | 2019. AUGUSZTUS

Mycoplasma infections of ducks and geese

D. Grózner¹
M. Gyuranecz^{1,2*}

1. MTA Agrártudományi Kutatóközpont
Állatorvos-tudományi Intézet
H-1143 Budapest, Hungária krt. 21.

2. Állatorvostudományi Egyetem
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék
H-1143 Budapest, Hungária krt. 23-25.

*e-mail: m.gyuranecz@gmail.com

Kacsák és ludak *Mycoplasma*-fertőzései

Grózner Dénes¹, Gyuranecz Miklós^{1,2*}

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők összefoglalják a vízibaromfifajok mycoplasmosisainak legjelentősebb kórokozóiról: a *Mycoplasma anatis*, *M. anseris*, *M. cloacale* és *M. sp. 1220* fajokról rendelkezésre álló legfontosabb ismereteket. Bemutatják, hogy a fent említett fajok gyakran okoznak megbetegedéseket, amelyek kialakulása és mértéke nagyban függ az állomány állategészségügyi státuszától és tartási körülményeitől. Megállapítják, hogy az oki diagnózis felállítása molekuláris biológiai módszerekkel lehetséges, valamint a fertőzött állományok antibiotikumos gyógykezelésével csökkenthető a *Mycoplasma*-fertőzés okozta gazdasági kár.

Köszönetnyilvánítás



- PhD hallgatók:
dr. Gróznér Dénes
Kovács Áron Botond
dr. Mitter Alexa
- Kutatócsoportom tagjai
- dr. Thuma Ákos, dr. Gyuris Éva, dr. Balka Gyula, Dénes Lilla
- dr. Molnár Béla
- Tranzit-ker Zrt: dr. Kiss Márton, Dobos Ádám, Spitzmüller László
- Bende-Goose 2004 Kft: Szabó János
- Gyakorló kollégák
- NÉBIH ÁTI munkatársai, Prophyl kft.
- Chris Morrow, Anna Sawicka
- Anyagi támogatás: NKFIH-Élvonal pályázat, UNKP, KDP



Elérhetőség:

Dr. Gyuranecz Miklós

Állatorvostudományi Kutatóintézet, 1143 Budapest, Hungária krt. 21.

email: miklos.gyuranecz@molliscience.com; Mobil: +36 30 2777 305;

www.molliscience.com

Köszönöm a figyelmet!