

Scientific final report – K_119594

Mycoplasma synoviae causes infectious synovitis and respiratory diseases in chickens and turkeys and may lead to egg shell apex abnormalities in chickens; hence possesses high economic impact on the poultry industry. The main aims of the present project were to improve the therapy and control of *M. synoviae* infections. As *M. synoviae* often co-infect the birds with *M. gallisepticum* and the pathogenesis, clinical signs, diagnostics and control of the two agents overlap in many cases we decided to investigate the two *Mycoplasma* species parallelly.

We performed all studies planned in the project plan and implemented several other projects as well which are closely related to the topic and popped-up during the investigation. With the support of the grant we published 9 international and 2 Hungarian papers in highly ranked journals (D1: 6, Q1: 3 and Q4: 2 Hungarian) with a cumulative impact factor 27.794. We presented our scientific results on national and international conferences as well. We gave 20 oral presentations and 2 poster presentations. We are also in discussions with two international veterinary diagnostics companies regarding to commercialize our molecular DIVA (differentiating infected from vaccinated animals) assays. Four PhD students participated in the different studies of the project. One of them wrote her PhD dissertation from the project results and defending her PhD in November, 2020. Three undergraduate students actively participated in the different studies and wrote their dissertations (TDK) from the results. Furthermore one of them won the first prize on the Veterinary Scientific Student Conference (TDK) with his dissertation/presentation in 2019. Based on the results and the established international collaborations we managed to set up an international, Hungarian-Dutch-French-Italian-Polish-Latvian consortium with us as a PI and submitted a proposal entitled „Antimicrobial stewardship in poultry mycoplasmosis” with a 1.4 million Euro budget to a H2020 EU call in March, 2020. We passed the pre-proposal step with high scores and we are currently waiting for the decision of the full-proposal. According to our plan this proposal will be the continuation of the 119594 NKFIH grant.

The major scientific results of the 119594 NKFIH grant are:

- 1) Globally diverse *M. synoviae* and *M. gallisepticum* strain collections were established. Tracheal, sinus, joint and oviduct swabs were taken from seropositive and clinically ill chickens and turkeys at farms from different geographical regions in Hungary. Samples were collected from other European, South and North-American, African and Asian countries as well with the help of our transport system. Altogether nearly 300 strains were isolated from each species.
- 2) Kreizinger, Z; Sulyok, KM; Gróznér, D; Bekő, K; Dán, Á; Szabó, Z; Gyuranecz, M: Development of mismatch amplification mutation assays for the differentiation of MS1 vaccine strain from wild-type *Mycoplasma synoviae* and MS-H vaccine strains. PLOS ONE, 12:e0175969. (2017), IF: 2,776, Q1: We provided melt-curve and agarose gel based mismatch amplification mutation assays (MAMA) to discriminate the MS1 vaccine strain from the MS-H vaccine strain and wild-type *M. synoviae* isolates. The assays are based on the A/C single nucleotide polymorphism at nt11 of a HIT family protein coding gene. The melt- and agarose-MAMAs reliably distinguish the MS1 vaccine strain genotype from the MS-H vaccine strain and wild-type *M. synoviae* isolate genotype from 10² template number/DNA sample. No cross-reactions with other avian

Mycoplasma species were observed. The assays can be performed directly on clinical samples and they can be run simultaneously with the previously described MAMAs designed for the discrimination of the MS-H vaccine strain. The developed assays are applicable in laboratories with limited facilities and promote the rapid, simple and cost effective differentiation of the MS1 vaccine strain.

- 3) Yvon C, Kreizinger Z, Wehmann E, Dán Á, Gyuranecz M. Új, molekuláris biológiai módszer fejlesztése a vad-típusú *Mycoplasma synoviae* törzsek és az MS-H vakcina törzs elkülönítésére. Akadémiai Beszámoló, Budapest, 2020. 01. 21.: The previously targeted genes (*obg*, *oppf*) are related to virulence and relatively rapidly mutate, thus they are not optimal for DIVA assay development. To avoid this failure we developed new MAMA assays targeting a more stable single nucleotide polymorphism in a housekeeping gene (data not shown).
- 4) Sulyok, KM*; Kreizinger, Zs*; Bekő, K*; Forró, B; Marton, Sz; Bányai, K; Catania, S; Ellis, C; Bradbury, J; Olaogun, OM.; Kovács, ÁB; Cserép, T; Gyuranecz, M: Development of Molecular Methods for the Rapid Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* Vaccine Strains from Field Isolates. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 57(6): e01084-18. (2019), IF: 5,897, D1: Seven melt-curve and agarose gel-based MAMAs and one PCR were provided to distinguish the *M. gallisepticum* vaccine strains and field isolates based on mutations in the *crmA*, *gapA*, *lpd*, *plpA*, *potC*, *glpK*, and *hlp2* genes. A total of 239 samples (*M. gallisepticum* vaccine and type strains, pure cultures, and clinical samples) originating from 16 countries and from at least eight avian species were submitted to the presented assays for validation or in blind tests. A comparison of the data from 126 samples (including sequences available at GenBank) examined by the developed assays and a recently developed multilocus sequence typing assay showed congruent typing results. The sensitivity of the melt-MAMA assays varied between 10^1 and 10^4 *M. gallisepticum* template copies/reaction, while that of the agarose-MAMAs ranged from 10^3 to 10^5 template copies/reaction, and no cross-reactions occurred with other *Mycoplasma* species colonizing birds. The presented assays are also suitable for discriminating multiple strains in a single sample. The developed assays enable the differentiation of live vaccine strains by targeting two or three markers/vaccine strain; however, considering the high variability of the species, the combined use of all assays is recommended. The suggested combination provides a reliable tool for routine diagnostics due to the sensitivity and specificity of the assays, and they can be performed directly on clinical samples and in laboratories with basic PCR equipment.
- 5) Bekő, K; Kovács, ÁB; Kreizinger, Zs; Marton, Sz; Bányai, K; Bánáti, L; Catania, S; Bradbury, J; Lysnyansky, I; Olaogun, OM, Gyuranecz M: Development of mismatch amplification mutation assay (MAMA) for the rapid differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* K vaccine strain from field isolates. AVIAN PATHOLOGY, 49(4): 317-324. (2020), IF: 2,338, Q1: The aim of this study was to develop a polymerase chain reaction based MAMA for the discrimination of K vaccine strain (K 5831, Vaxxinova Japan K.K.). After determining the whole genome sequence of the K strain, primers were designed to detect seven different vaccine-specific single nucleotide polymorphisms. After evaluating preliminary results, the MAMA-K-*fruA* test detecting a single guanine-adenine substitution within the *fruA* gene (G88A) was found to be the most applicable assay to distinguish the K vaccine strain from field isolates. The detected K strain-specific single nucleotide polymorphism showed genetic stability after

serial passage *in vitro*, but this stability test should still be evaluated *in vivo* as well, investigating a large number of K strain re-isolates. The MAMA-K-fruA assay was tested on a total of 280 culture and field samples. The designed assay had 10² and 10³ template copy number/μl sensitivity in melt-curve analysis based and agarose-gel based assays, respectively, and showed no cross reaction with other avian *Mycoplasma* species. The new MAMA provides a time- and cost-effective molecular tool for the control of vaccination programmes and for diagnostics.

- 6) Kreizinger, Zs; Sulyok, KM; Bekő, K; Kovács, Á; Grózner, D; Felde, O; Marton, Sz; Bányai, K; Catania, S; Benčina, D; Gyuranecz, M: Genotyping *Mycoplasma synoviae*: Development of a multi-locus variable number of tandem-repeats analysis and comparison with current molecular typing methods. VETERINARY MICROBIOLOGY, 226: 41-49. (2018), IF: 2,791, D1: The aims of the present study were to develop a multi-locus variable number of tandem-repeats analysis (MLVA) method for the typing of *M. synoviae* isolates and to evaluate the currently used molecular typing methods which are applicable directly on clinical samples. Tandem repeat (TR) regions were selected from the whole genome sequence of the *M. synoviae* type strain (WVU1853) to characterize the genetic diversity of 86 *M. synoviae* strains originating from 15 countries. The strains were also submitted to multi-locus sequence typing (MLST) assays, *vlhA* gene sequence analysis and to assays designed to differentiate live vaccine strains from field strains. The developed MLVA involved the examination of seven TR regions and provides similar genetic resolution as the tested MLST assays by identifying 35 genotypes among the tested strains. Differentiation of the live vaccine strains from field strains was also successful with the developed assay. The provided MLVA method proved to be a highly discriminative, rapid and cost-effective alternative typing technique for the genetic characterization of *M. synoviae* and it is also suitable for the complementation of live vaccine strain differentiating assays in ambiguous cases.
- 7) Bekő, K; Kreizinger, Zs; Sulyok, KM; Kovács, ÁB; Grózner, D; Catania, S; Bradbury, J; Lysnyansky, I; Olaogun, OM; Czanik, B; Ellakany, H; Gyuranecz, M: Genotyping *Mycoplasma gallisepticum* by multilocus sequence typing. VETERINARY MICROBIOLOGY, 231: 191-196. (2019), IF: 3,030, D1: The aim of this study was to develop an MLST assay which can determine phylogenetic distances between *M. gallisepticum* strains. After analysing more than 30 housekeeping genes, six loci (*atpG*, *dnaA*, *fusA*, *rpoB*, *ruvB*, *uvrA*) were selected for the MLST assay due to their genomic location and high diversity. Examination of 130 *M. gallisepticum* strains with this MLST method yielded 57 unique sequence types (STs) with a 0.96 Simpson's index of diversity. Considering the large number of STs and high diversity index, this MLST method was found to be appropriate to discriminate *M. gallisepticum* strains. In addition, the developed method was shown to be suitable for epidemiological investigations, as it confirmed linkage between related strains from outbreaks in different farms. Besides, MLST also suggested high impact of extensive international trade on the spread of different *M. gallisepticum* strains. Furthermore this method can be used for differentiation among vaccine and field strains.
- 8) Kreizinger, Zs; Grózner, D; Sulyok, KM; Nilsson, K; Hrivnák, V; Benčina, D; Gyuranecz, M: Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma synoviae* strains originating from Central and Eastern Europe. BMC VETERINARY RESEARCH, 13: 342. (2017), IF: 1,948, D1: The aim of the present study was to determine the *in vitro*

susceptibility to 14 different antibiotics and an antibiotic combination of *M. synoviae* strains originating from Hungary and other countries of Central and Eastern Europe. Minimal inhibitory concentration (MIC) values of a total of 41 *M. synoviae* strains were determined by the microbroth dilution method. The strains were collected from Hungary (n = 26), Austria (n = 3), the Czech Republic (n = 3), Slovenia (n = 3), Ukraine (n = 3), Russia (n = 2) and Serbia (n = 1). Tetracyclines (with MIC50 values of 0.078 µg/ml, ≤0.25 µg/ml and 0.5 µg/ml for doxycycline, oxytetracycline and chlortetracycline, respectively), macrolides (with MIC50 values of ≤0.25 µg/ml for tylvalosin, tylosin and tilmicosin), pleuromutilins (with MIC50 values of 0.078 µg/ml and ≤0.039 µg/ml for tiamulin and valnemulin) and the combination of lincomycin and spectinomycin (MIC50 1 µg/ml (0.333/0.667 µg/ml)) were found to be the most effective antibiotic agents against *M. synoviae in vitro*. High MIC values were detected in numerous strains for fluoroquinolones (with MIC50 values of 1.25 µg/ml and 2.5 µg/ml for enrofloxacin and difloxacin), neomycin (MIC50 32 µg/ml), spectinomycin (MIC50 2 µg/ml), lincomycin (MIC50 0.5 µg/ml) and florfenicol (MIC50 4 µg/ml). Nevertheless, strains with elevated MIC values were detected for most of the applied antibiotics. In the medical control of *M. synoviae* infections the preliminary *in vitro* antibiotic susceptibility testing and the careful evaluation of the data are crucial. Based on the *in vitro* examinations doxycycline, oxytetracycline, tylvalosin, tylosin and pleuromutilins could be recommended for the therapy of *M. synoviae* infections in the region.

- 9) Morrow, CJ*; Kreizinger, Zs*; Achari, RR; Bekő, K; Yvon, C; Gyuranecz, M: Antimicrobial susceptibility of pathogenic mycoplasmas in chickens in Asia. VETERINARY MICROBIOLOGY, 250:108840. (2020), IF: 3,030, D1: *Mycoplasma synoviae* (n = 26) and *M. gallisepticum* (n = 11) isolates were gained from 164 clinical samples collected from China, India, Indonesia, Malaysia, Philippines, Republic of Korea and Thailand. Most isolates were from commercial chicken production systems. A method of filtering (0.45 µm) samples immediately after collection was convenient allowing over a week for transit to the laboratory. MICs were characterized by a broth microdilution method to enrofloxacin, difloxacin, oxytetracycline, chlortetracycline, doxycycline, tylosin, tilmicosin, tylvalosin, tiamulin, florfenicol, lincomycin, spectinomycin and lincomycin and spectinomycin combination (1:2). Increased MICs to various antimicrobials were seen in different isolates but appeared largely unrelated to the antimicrobial treatment histories. Overall, the results were similar to other MIC surveys around the world. Generally, low MICs to tetracyclines, tiamulin and tylvalosin were observed. Increased tilmicosin MICs were observed in both *M. synoviae* and *M. gallisepticum* isolates (≥64 µg/ml MIC90 values) and this was seen in all isolates with high tylosin MICs. Increases in lincomycin MICs were mostly associated with increases in tilmicosin MICs. The results also suggested that antimicrobial use after mycoplasma vaccination may interfere with vaccine strain persistence and efficacy (field strains were more commonly observed in flocks that had treatments after vaccination) and this area warrants more investigation. The study shows that isolation and MIC determination can be done from remote locations and suggests that this may provide information that will allow more effective use of antimicrobials or other methods of control of avian mycoplasma in chickens (e.g. live vaccines) and therefore more responsible use of antimicrobials from a one health perspective.

- 10) Bekő, K; Kreizinger, Zs; Kovács, ÁB.; Sulyok, K; Marton, Sz; Bányai, K; Catania, S; Feberwee, A; Wiegel, J; Dijkman, R; ter Veen, C; Lysnyansky, I; Gyuranecz M: Mutations potentially associated with decreased susceptibility to fluoroquinolones, macrolides and lincomycin in *Mycoplasma synoviae*. VETERINARY MICROBIOLOGY, 248: 108818 (2020), IF: 3,030, D1: Using broth microdilution method MIC values to fourteen antibiotics related to eight antimicrobial groups were determined in 96 *M. synoviae* strains. Whole genome sequencing and sequence analysis revealed mutations potentially associated with decreased susceptibility to fluoroquinolones, macrolides and lincomycin. Molecular markers responsible for the high MICs to fluoroquinolones were found in the *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes. Besides, single nucleotide polymorphisms identified in genes encoding the 23S rRNA were found to be responsible for high MICs to the 50S inhibitor macrolides and lincomycin, while amino acid change in the 50S ribosomal protein L22 could be associated with decreased susceptibility to macrolides. The revealed mutations can contribute to the extension of knowledge about the genetic background of antibiotic resistance in *M. synoviae*. Moreover, the explored potentially resistance-related mutations may serve as targets for molecular biological assays providing data of antibiotic susceptibility prior to the laborious and time-consuming isolation of *M. synoviae* strains.
- 11) Bekő, K; Kreizinger, Z; Yvon, C; Saller, O; Catania, S; Feberwee, A; Gyuranecz, M: Development of molecular assays for the rapid and cost-effective determination of fluoroquinolone, macrolide and lincosamide susceptibility of *Mycoplasma synoviae* isolates. PLOS ONE, in press (2020), IF: 2,776, Q1: The aim of this study was to develop MAMAs to detect resistance-associated mutations in *M. synoviae*. *M. synoviae* strains with previously determined MICs and whole genomes (n=92) were used for target selection and assay specification. For the evaluation of the developed assays, 20 clinical samples and an additional 20 *M. synoviae* isolates derived from these specimens were also included in this study. MIC values of these 20 isolates were determined by broth microdilution method. Five MAMAs were designed to identify elevated MICs of fluoroquinolones, while three MAMAs were developed to detect decreased susceptibility to macrolides and lincomycin. The sensitivity of the MAMA tests varied between 10^2 - 10^4 template copy number/reaction depending on the assay. Clinical samples showed identical genotype calls with the *M. synoviae* isolates derived from the corresponding specimens in each case. Supporting the results of conventional *in vitro* sensitivity tests, our approach provides a feasible tool for diagnostics. Rapidity, robustness and cost-effectiveness are powerful advantages of the developed assays. Supporting prudent antibiotic usage instead of empirical treatment, the use of this method can reduce significantly the economic impact of *M. synoviae* in the poultry industry and decrease bacterial resistance-related public health concerns.
- 12) Bekő, K; Gyuranecz, M: *Mycoplasma synoviae* okozta baromfibeetegségek. MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA, 142(1): 17-28. (2020), IF: 0,107, Q4: In order to make the up to date knowledge and our research results accessible for the Hungarian veterinary community we wrote a review article about *M. synoviae* to the Hungarian Veterinary Journal in Hungarian.

13) Bekő, K; Gyuranecz, M: Baromfiállományok *Mycoplasma gallisepticum* okozta fertőzései. MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA, 142(6): 349-364. (2020), IF: 0,107, Q4: In order to make the up to date knowledge and our research results accessible for the Hungarian veterinary community we wrote a review article about *M. gallisepticum* to the Hungarian Veterinary Journal in Hungarian.

Budapest, 26th of October, 2020



Miklós Gyuranecz

Az NKFI Hivatal 2021. július 14-én kelt levelében kézhez kapott, a kollégium által feltett kérdésekre adott válaszaim:

1. A hazai és nemzetközi törzsgyűjteményük adatbázisa nyilvánosan elérhető-e?

A mycoplasmosis nagy gazdasági kárral és jogi következményekkel járó megbetegedéseket okoz a baromfi ágazatban. A fertőzésekhez gyakran kötődnek szavatossági és egyéb peres ügyek. Így minden hazai és nemzetközi *Mycoplasma* kimutatást/izolálást a lehető legnagyobb diszkréció mellett kezelünk. Éppen ezért a törzsekre vonatkozó részletes információkat tartalmazó teljes adatbázis szabadon nem hozzáférhető. Csak kérés esetén, megfelelő titoktartási nyilatkozat aláírása után, és megfelelően előszűrve bocsájtjuk más kutatók rendelkezésére. A világ más *Mycoplasma* laborjai is ugyanígy járnak el. Az egyes publikált cikkek (pl: Kreizinger és mtsai., 2018; Bekő és mtsai., 2019; stb.) és egyes internetes adatbázisok (<https://pubmlst.org/organisms/mycoplasma-synoviae/>; https://pubmlst.org/bigfdb?db=pubmlst_mgallisepticum_isolates) tartalmazzák az adott kutatás megértéséhez szükséges alap információkat (ország, év, gazdafaj, stb.) az adott kutatásban vizsgált törzsekről.

2. A *M. synoviae* törzsek teljes genomjának szekvenálási adatai génbankban megtalálhatók-e? Milyen fokú és főleg mely géneket érintő diverzitást/variabilitást figyeltek meg az egyes állományokon belül illetve között? Esetleg egyetlen egyeden belül?

A *M. synoviae* törzsek teljes genom szekvenciái szabadon nem hozzáférhetőek a Génbankban. Ennek oka, hogy még GWAS vizsgálatot végzünk a törzseken, így amíg ennek az eredményeit nem publikáljuk, addig a teljes genom szekvenciákat sem tesszük szabadon hozzáférhetővé. Az egyes publikált eredményekhez (Kreizinger és mtsai., 2018; Bekő és mtsai., 2020, stb.) kötődő specifikus gének szekvenciái azonban szabadon elérhetőek a Génbankban. Az azonosító számok listáit az adott publikációk tartalmazzák.

A Kreizinger et al., 2018 cikkben részletesen kifejtettük, hogy milyen diverzitást és variabilitást figyeltünk meg az egyes *M. synoviae* genotipizáló rendszerek és markerek esetén. A Supplementary Table 2-ben részletesen bemutatjuk allélonként/génekenként is a variabilitást (Simpson's diversity index). Diverzitást minden vizsgált allél/gén mutatott, a vizsgált 12 MLST gén, 7 MLVA allél és a *vlhA* gén 0,069-0,902 közötti Simpson-féle diverzitás index értékeket adott.

Egy állományból egy izolátumot vizsgáltunk, melyet 5 állat légső tampon pooljából tenyésztettünk ki. Így az azonos telepen különböző években tartott állományokból származó törzsek genotípusait tudtuk összehasonlítani (megegyeztek mindkét esetben: MYCAV186 és 282, illetve MYCAV188 és 300), illetve az azonos integrációhoz tartozó telepekről származó törzsek genotípusait vetettük össze (pl. 2016-os járvány, azonos genotípusok). A társszerzőktől származó, külföldi izolátumok esetében az azonos helyről származó törzsek azonos genotípust mutattak.

3. Milyen tendenciákat tudtak megállapítani a hazai/közép-európai *M. synoviae* törzsek antibiotikum-érzékenységgel kapcsolatban? Minden szerrel szemben nő a rezisztencia, vagy csak bizonyos csoportokkal kapcsolatban? Melyik az a szer vagy hatóanyagcsoport, ami a legnagyobb valószínűséggel hatásos lehet?

A *M. synoviae* törzsek antibiotikum érzékenységgel kapcsolatos eredményeket és tendenciákat részletesen leírtuk Kreizinger és mtsai. (2017) cikkében, így csak néhány főbb megállapítást szeretnék kiemelni. A fluorokinolonokkal szemben egyértelműen nő a rezisztencia, különösen a hosszú termelési ciklusú madarakban, mint a brojlercsirke szülőpár és az étkezési tojást termelő tojótyúk állományok. A rövidebb életciklusú brojler pulyka állományokban ez kevésbé figyelhető meg. A makrolidok közül elsősorban a tilmikozinnal szemben nő a rezisztencia. Ahogy a jelentés 8. pontjában is írtam a tilozin, tilvalozin, különösen pedig a tetraciklinek (OTC, CTC, doxiciklin) és a tiamulin kifejezetten hatékonyak a *M. synoviae* fertőzések kezelésére az *in vitro* vizsgálataink és a telepi tapasztalatok alapján egyaránt.

4. Előfordulhat-e a *M. synoviae* többféle genetikai variánsa egyetlen egyedből vett mintában? Ha igen, ez nem jelent-e akadályt az antibiotikum-érzékenység meghatározásában?

Ritkán, de előfordulhat többféle genetikai variáns ugyanazon egyedben. Talán a leggyakrabban a vakcinázott és/majd vad törzssel fertőzött állományokban fordulhat ez elő. A klasszikus MIC érték meghatározás során ez alapvetően nem jelent problémát, mert előtte a törzs akár többszöri filter klónozáson (tisztításon) esik át. Amennyiben genetikai alapú rezisztencia meghatározás történik (a maga korlátainak figyelembevételével) közvetlenül a klinikai mintából, akkor akár problémát is jelenthet, feltéve, ha különbözik az antibiotikum rezisztencia profilja a törzseknek. Amennyiben izolált és filter klónozott törzsön történik a genetikai alapú antibiotikum rezisztencia meghatározás, akkor a MIC meghatározáshoz hasonlóan nem jelenthet problémát. A filter klónozással a technikai problémát kiküszöböljük, de közben információt veszíthetünk. Ez egy olyan kérdéskör, amit jelenleg is vizsgálunk. Kíváncsiak vagyunk, hogy az izolálási folyamat során változik-e esetleg a törzsek/törzskóktélok rezisztencia mintázata. Elvesztik-e esetleg az eredetileg rezisztens klónok a rezisztenciájukat? Kipusztulnak-e esetleg vagy túlnövik-e őket a nem rezisztens társiak? Miként tudjuk ezt esetleg kimutatni? Egyéb tulajdonságok (efflux pumpa, biofilm képző képesség, stb.) milyen szerepet játszanak az antibiotikum rezisztencia kialakulásában?

5. A gyakorló kollégáktól kaptak-e pozitív (esetleg negatív) visszajelzést a tesztek alapján ajánlott antimikrobiális szerek gyakorlati hatékonyságára vonatkozóan?

Igen, egyértelműen pozitív visszajelzéseket kaptunk a MIC vizsgálatokkal, és ahol lehetőség nyílt, a genetikai alapú rezisztencia meghatározással kapott eredményekkel kapcsolatban is. A tetraciklinek, a tiamulin, és adott esetekben az egyes makrolid antibiotikumok megfelelően alkalmasak a betegség kezelésére/klinikai tünetek csökkentésére.

6. A tervezett/ajánlott mentesítési program fő lépéseit szíveskedjenek kifejtetni, különös tekintettel a DIVA rendszer alkalmazási lehetőségeire.

A leghatékonyabb mentesítési eljárás az állománycsere, mentes madarak betelepítése, majd az állapot fenntartása megfelelő biobiztonsági intézkedések segítségével önmagában vagy vakcinák alkalmazásával kiegészítve.

Amennyiben ez nem lehetséges (pl: vegyes életkorú telepek), ott a vakcinák segítségével lehet mentesíteni a telepet. Ideális esetben a napos madarak mentes állományból érkeznek. Kevésbé ideális esetben fertőzött szülőktől származnak. Utóbbi esetben érdemes a napos/néhány hetes madarakat *Mycoplasma* ellenes antibiotikummal kezelni a vakcinázás előtt a vertikális fertőzési nyomás csökkentése érdekében. Amennyiben megoldható, a madarakat a fertőzött teleptől legalább 10 km-re lévő, külön telepen érdemes előnevelni és vakcinázni (4-9 hetes korban), majd csak az immunitás kialakulása után a fertőzött telepre átszállítani. Amennyiben nem megoldható az elkülönített előnevelés, akkor a vakcinázást minél előbb (3 hetes korban) el kell végezni. Erős *M. gallisepticum* fertőzés esetén, azokban a régiókban (pl. USA, Dél-Amerika, Ázsia), ahol engedélyezett az F vakcina törzs használata, meg lehet próbálkozni a két lépcsőben történő mentesítéssel. A vad törzset először az F vakcina törzssel (kevésbé attenuált) megpróbálni kiszorítani, majd egy második lépésben az F törzset kell kiszorítani a 6/85 vagy ts11 vakcina törzsek valamelyikével.

A vakcinázást követő 3-6 hét (vakcina törzstől függően) múlva kell szájpaplás hasadék/légcső tampon mintát venni, járványtani egységenként minimum 20 állattól DIVA PCR vizsgálatra, a vakcinázás hatékonyságának ellenőrzésére. Az ezt követő időszakban számos körülmény figyelembevétele mellett kell felállítani a monitoring programot. Csak illusztráció képen két véglet: egy nemzetközi nemesítő cég esetén minimum 2 hetente 60 állatot vizsgálni kell. De egy harmadik világbeli kis brojler tenyésztő cég esetén valószínűleg csak arra van anyagi lehetőség/szükség, hogy a napos brojlerben monitorozza a légzsákgyulladásos esetek számának napi alakulását. De ugyanígy befolyásolja a monitoringot, hogy *M. synoviae* vagy *M. gallisepticum* ellen történt a vakcinázás, mert a két kórokozó szaporodási dinamikája a nyálkahártyán eltérően alakul (lásd., Bekő és Gyuranecz, 2020).

Ritkán, de előfordul, hogy a sikeres vakcinázás ellenére megtelepszik a vad törzs is az állományban, amit a DIVA PCR-ekkel tudunk kimutatni. Ilyenkor kifejezett hangsúlyt kell fektetni a napos madarak monitorozására, a vertikális terjedés kizárása érdekében. Egy-két esetet eltekintve szerencsére a vakcinázás a vad törzssel való ráfertőződés esetén is megvéd a vertikális terjedéstől. Nagyon fontos, hogy a mentesítést mindig fentről lefelé haladva végezzük (pl: nagyszülőpár → szülőpár → brojler/).

A vakcinákkal történő sikeres mentesítés végén a körülmények határozzák meg a folytatást. Ha alacsony a környezeti terheltség (régió járványtani helyzete, környező telepek távolsága kedvező, stb.) és megfelelő a biobiztonság, akkor akár el is lehet idővel hagyni a vakcinát. Ha a körülmények nem kedvezőek, akkor pedig folyamatos vakcinázással, és a körülményekhez adaptált monitoring programmal (DIVA) kell fenntartani a megfelelő állategészségügyi és gazdasági állapotot.

7. A zárójelentés részletes részének 3. pontjában szakszerűtlenül megfogalmazott, érthetetlen kijelentés van, ami teljesen megalapozatlannak tűnik. Ez javítandó.

Csak egy elütésből származó nyomdahiabáról volt szó. Mindenesetre a mondatot kissé át is fogalmazva tisztáztam a kérdéses pontot.

Budapest, 2021. 09. 10.



Gyuranecz Miklós