

Válasz Dr. Szmolka Annamária bírálataira

Ezúton köszönöm Dr. Szmolka Annamáriának, hogy elfogadta és elvégezte az értekezésem bírálatát, valamint véleményét, amellyel munkám nyilvános vitára bocsátását javasolta. Köszönöm a dolgozatommal kapcsolatos tárgyilagos, világosan megfogalmazott kritikai észrevételeit és kérdéseit, amelyekre a válaszaim az alábbiak.

Válaszok a kritikai észrevételekre

Különböző nemzetségekbe tartozó baktériumtörzsek metagenomikai analízise során megállapította, hogy a szigorúan vektorokhoz kötött intra- és extracelluláris kórokozók többségében a rezisztenciagének gyakorisága elhanyagolható vagy azok teljesen hiányoznak (pl. Anaplasma, Borrelia). Ezzel szemben a gazdaszervezetekben levő fajoknál (Coxiella) szignifikáns összefüggést mutatott ki az állati (szarvasmarha) eredet és a rezisztencia-pozitivitás között. Ugyanakkor hangsúlyozandó, hogy bár e kórokozók közül több is terjed kullancsok révén, a kompetens ízeltlábú vektorok köre szélesebb. Emiatt a tudományos pontosság megköveteli a „kullancs” helyett az általánosabb „vektor” kifejezés használatát.

Válasz: Egyetérték a Bírálóval, hogy az általunk vizsgált kórokozókat nem csak kullancsok, de további vektorok is terjeszthetik. A dolgozatban azért a „kullancs” vektorra vonatkozóan írtam, mert az egyes baktériumfajok elemzésbe való bevonásának feltételül azt szabtuk, hogy ismert-e a kullancsterjesztette voltak.

Összesen 574 Escherichia coli színtenyészet fenotípusos és genotípusos adatainak összevetése igazolta, hogy a törzsek fenotípusos rezisztenciája a rezisztom diverzitása alapján elfogadható megbízhatósággal becsülhető. Ezen adatokra alapozva felvetette az „antimikrobiális rezisztencia-potenciál” (AMRP) fogalmának bevezetését, amely komplex mikrobiológiai minták metagenomikai alapú rezisztom-értelmezését teszi lehetővé. Véleményem szerint azonban a terminológia további finomításra szorul, ugyanis az adott minta rezisztencia potenciáljának meghatározásához elengedhetetlen rezisztom mobilitási potenciáljának integrálása is.

Válasz: Teljesen egyetérték a Bírálóval, hogy az AMRP-vel kapcsolatban számos szempontot, így az antimikrobiális rezisztenciagének (ARG) mobilitását is figyelembe kell venni, így sok munkát ad még számomra is a téma.

A dolgozat bevezető részében célszerű lett volna egy olyan ábrát elhelyezni, amely szemlélteti azokat a mikrobiális ökológiai összefüggéseket, amelyek a vizsgált niche-ket az Egy Egészség keretrendszeren belül összekapcsolják.

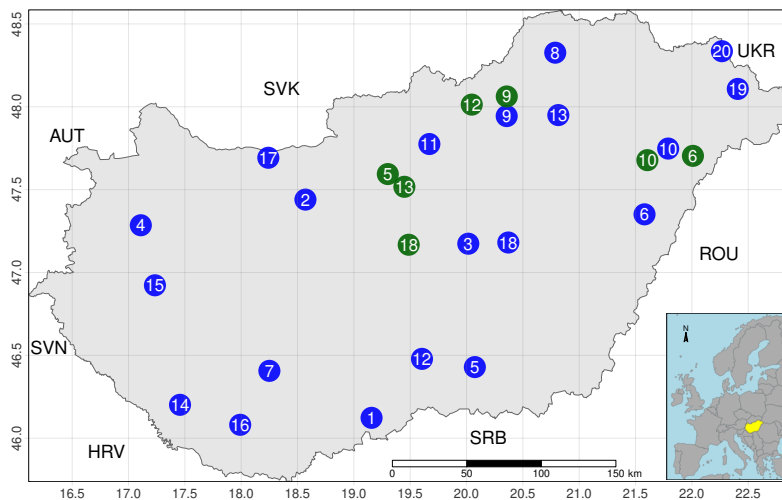
Válasz: Egyet kell értenem a bírálóval, hogy ez segítette volna a dolgozat átláthatóságát. A nyilvános védésre készített diasorban pótlom ezt a hiányosságot.

A saját gyűjtésű mintákon végzett mézelő méh mikrobiom vizsgálatok esetében hiányoltam a módszertani alapadatok – vizsgált családok száma, családon belüli mintanagyság, illetve a mintavételezési protokoll - közlését. Ugyanez vonatkozik a kullancs mintákra is.

Válasz: Valóban jobb lett volna bővebben írni a mintákról, mintavételezésről, az alábbiakban pótlom ezt. **Mézelő méhek bélmikrobiom vizsgálata.** A szezonális változások vizsgálatára két mintavételi alkalmat terveztünk, egyet a méztermelési időszak kezdetén, egyet pedig a csúcspontján. Mivel azonban az évszak mellett az éghajlati, időjárási környezet is fontos lehet a bélmikrobiota összetételében, vizsgálatunk mintavételi helyeit a hőmérsékleti és csapadékviszonyokat figyelembe véve határoztuk meg. E két klimatikus

paraméter tekintetében, Magyarországra vonatkozóan reprezentatív mintavételi terv alapján gyűjtöttük a méhket.

Magyarország 175 járásának klimatikus jellemzése céljából meteorológiai adatok töltöttünk le a 2008-2017 közötti időszakra vonatkozóan az ERA-Interim reanalízis adattárból, $0,125^\circ$ térbeli felbontással (Dee et al., 2011). Ezen adatok felhasználásával becsültük a 10 éves átlagos növekedési foknap (GDD) és összcsapadék járási értékét. A GDD esetén hűvösebb és melegebb, a csapadék alapján szárazabb és csapadékosabb kategóriákba soroltuk a járásokat, mindkét változó esetén az országos medián jelentette a határértéket. Így a GDD tekintetében a medián alatt hűvösebb, a felett melegebb, csapadék vonatkozásában a medián alatt szárazabb, a felett pedig csapadékosabb kategóriába soroltuk a járásokat.



1. ábra: A mézelő méh mikrobiom vizsgálat mintavételi pontjai. A kék pontok a márciusi, illetve a nem vándorló állományok májusi mintavételi helyét, míg a zöld pontok a májusban vándorló állományokat (5., 6., 9., 10., 12., 13., 18.) jelzik. A 20. méhészet esetében a két mintavétel közti földrajzi eltérés olyan kicsi, hogy a térképen nem ábrázoltam külön.

Annak érdekében, hogy a mintáink e klimatikus paraméterekre vonatkozóan reprezentatívak legyenek Magyarországra nézve, úgy választottunk ki 20 járást, hogy az azokon belüli klimatikus kategóriák aránya megegyezzen az országos arányokkal. A járások ilyen módon való kijelölését rétegzett térbeli véletlen mintavételezésével végeztük az spsurvey (Kincaid et al., 2019) csomag függvényeivel, R-környezetben (R Core Team, 2018). Minden így kijelölt járásból egy-egy méhészetet választottunk ki, országosan összesen 20 méhészetet, a méhészekkel folytatott személyes megbeszélések alapján.

A mintavételre a méztermelési időszakban kétszer került sor (az elején és a csúcsidőszakban). Az első (márciusi) 2019.03.20. és 2019.03.25., a másodikat (májusi) 2019.05.23. és 2019.06.01. között végeztük (1. ábra). A márciusi mintavételkor méhészetenként három-három méhcsaládot választottunk ki, és ugyanazokat a családokat mintáztuk májusban is. Minden alkalommal családonként 20-20 dolgozót gyűjtöttünk és fagyasztottunk le azonnal szárazjéggel.

A májusi mintavétel során két méhészetben (6., 13.) a három méhcsaládból csak kettő volt már meg a márciusi mintavételi időszak három méhcsaládjából, így csak azokat mintáztuk már, új családot nem vontunk be harmadikként. A méhcsaládok vándorlása nyolc méhészetben (5., 6., 9., 10., 12., 13., 18., 20.) változtatta meg az állományok földrajzi helyét. Ezek közül négy méhészetnél (5., 9., 12., 13.) a májusi tartási hely járásának klimatikus kategóriája megváltozott a márciusihoz képest. Két méhészet melegebből hűvösebbre területre (5., 12.), a 9. és 12. méhészet szárazabb területről csapadékosabbra vándorolt. A 13. méhészet csapadékosabb

járásból szárazabba vándorolt. A felmérésbe vont állományokban mindkét mintavételi időszakban kérdőíves adatgyűjtést végeztünk az állategészségügyi előzményekre vonatkozóan.

A mintákat az Állatorvostudományi Egyetem Parazitológiai és Állattani Tanszékén készítettük elő újgenerációs szekvenálásra. A mélyhűtött mintákból családonként 10-10 egyedet választottunk ki, amelyeknek eltávolítottuk a teljes gyomor-bélrendszerét. Így méhészetenként 3×10 dolgozó gyomor-bélrendszert távolítottunk el, amelyeket méhészetenként pool-oztunk. Minden méhészethez új, korábban nem használt preparáló csipeszt használtunk, és csak egyetlen pool (3×10 bél) feldolgozásához.

Ixodes ricinus metagenom-vizsgálat. A mézelő méheknél leírt módszer szerint a 20 kiválasztott járáson belül azonosítottunk egy-egy erdőszeget, ahonnan végül mintát vettünk. A gazdát kereső kullancsok gyűjtése 2019.3.23. és 2019.5.20. között történt ún. „flagging & dragging” eljárással. A laboratóriumban a fagyasztott mintákból származó kullancsokat taxonómiaiilag meghatároztuk (Estrada-Peña et al., 2018). Az *I. ricinus* fajba sorolt kullancsok közül mintavételi helyenként, véletlenszerűen tíz nimfát és tíz nőtényt választottunk ki. Mivel három mintavételi helyen nem tudtuk összegyűjteni a minimálisan szükséges tíz nőtényt és tíz nimfát, a szekvenálásba és a további elemzésekbe csak a fennmaradó 17 helyszínen gyűjtött minták kerültek be. Az *Ixodiphagus hookeri* vizsgálatba e mintákon túl bevontunk ugyanazon gyűjtési időszakból, kirándulás és kutyasétáltatás céljából kedvelt helyekről származó, további négy-négy *I. ricinus* nimfa és nőtény mintát metagenom-szekvenálási adatait is. Minden minta esetén a DNS-kivonás előtt a kullancsokat 99,8%-os alkohollal kétszer mostuk.

Releváns kiegészítés lenne a mézelő méh és kullancs metagenom antimikrobiális rezisztencia mintázataira vonatkozó hazai adatok bemutatása.

Válasz: Ezekben a vizsgálatokban nem volt célunk a rezisztom vizsgálata. De a Bíráló felvetésére megvizsgáltam a mintákat (Comprehensive Antibiotic Resistance Database, CARD v4.0.1), 90%-os lefedettségű és 90%-os szekvenciális azonossági határértékek alkalmazásával. Így a mézelő méhekből származó márciusi mintáinkban *E. coli*-hoz köthető tetR (6. méhészet), illetve *Gilliamella* nemzetséghez köthető *Escherichia coli* EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin (7. méhészet) AMR-determinánsokat azonosítottam. A májusban, a 20. méhészetből vett mintában azonosítottam a *Gilliamella* nemzetséghez köthető *Escherichia coli* EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin-t. Ugyanez az AMR-determináns kimutatható a 16. méhészet márciusi és májusi mintájában is, de az azt hordozó kontig taxonklasszifikációja az alkalmazott 50%-os konfidencia mellett nem adott eredményt. A kullancsminták egyikében sem azonosítottam ARG-t.

A nyerstej mikrobiom eredmények megvitatása során indokolt lenne a legfrissebb hazai szakirodalmi adatok (pl. Kerek et al., [doi: 10.3390/vetsci11060265]) beépítése.

Válasz: Egyetértek, valóban jobb lett volna ennél a résznél részletesen diszkutálni az eredményeket.

Bár a teljes metagenomikai adatsor kimerítő elemzése messze túlnyúlna a dolgozat keretein, - a szilázs rezisztomjához hasonlóan a többi fejezetben is- kiemelten fontosnak tartom azoknak a kritikus rezisztencia determinánsoknak a részletes tárgyalását, amelyek széles gazdaspektrummal, illetve niche-eken átívelő transzferpotenciállal rendelkeznek.

Válasz: Egyetértek a bírálóval. Ezért az eredeti közleményeinkben ezekre részletesen kitértünk, a dolgozatban ezt rövidítettem.

A vektor-közvetítette bakteriális metagenom vizsgálatok fejezet értékes eredményeit sajnálatos módon megbontja egy oda nem illő angol nyelvű bekezdés.

Válasz: A jelzett fejezetben valóban úgy tűnhet, hogy a harmadik bekezdés angol, de valójában ott felsoroltam azon AMR-determinánsokat, amelyeket az egyes fajokban azonosítottunk. Ott az ARG-k mellett olyan AMR-ben szerepet játszó mutációkat is említetek, amelyek neve nem rövidítés. Mivel az alkalmazott adatbázisban ezen AMR-determinánsoknak ez a neve angolul szerepel, nem fordítottam le, mert különben a visszakeresésük nehézségeket jelentene. Belátom, hogy ez nem szép megoldás, jobb lett volna táblázatosan bemutatni ezeket az eredményeket a félreérthetőség elkerülése céljából.

Kiemelten fontosnak tartom a helyes írásmód használatát az olyan gének esetében, mint a blaTEM és az blaOXA. Ezzel kapcsolatos kérdésem, hogy a metagenomikai vizsgálatok lehetővé teszik-e az allél-szintű rezisztenciameghatározást, ami a TEM és OXA géncsaládok funkcionális annotációja szempontjából kritikus jelentőségű?

Válasz: Valóban fontos lenne az ARG-k kapcsán kialakítani egységes, helyes írásmódot. Sajnos az ARG-adatbázisok is részben eltérő elnevezéseket tartalmaznak, emiatt pl. nem lehet név alapján tökéletesen megfeleltetni egymásnak az azokban elérhető géneket. Dolgozatomban – egy kivételével – a közleményekben használt neveket használtam. Ugyanakkor a bemutatott eredményeink összehasonlíthatósága céljából egységesítettem az ARG-neveket, amit röviden jeleztem az eredmények bevezető bekezdésében.

A kérdésre a válaszom, hogy igen, különböző mértékben, de az adatbázisok tartalmaznak az allélek-re vonatkozó adatokat. A mi összehasonlító vizsgálataink alapján ebben az adattartalomban is a CARD a legátfogóbb, bár sajnos, az utóbbi időben frissítése nagyon megritkult. Meg kell jegyezni, hogy az adattartalom még nem jelenti azt, hogy a rutin ARG-detektálás során a felhasználó kiaknázza ezt a lehetőséget is. Az ARG-adatbázisok sokkal több információt tartalmaznak, mint amennyit az általános pipeline-ok használnak.

Válaszok a feltett kérdésekre

A mézelőméh bélbakterióta összetételének dinamikus változásai alapján, véleménye szerint azonosíthatók-e a méztermelési időszakban olyan kritikus periódusok, amikor a méhek bakteriális és vírusos patogénekkal szembeni fogékonysága előrejelezhetően megnő?

Válasz: A bakteriomvizsgálatunk célja az volt, hogy képet kapjunk arra vonatkozóan, hogy mekkora az egészséges mézelő méhek bélbakteriotájának természetes variabilitása. Ezzel egyfajta referenciát kapni arra vonatkozóan, hogy az egészségestől való kóros eltéréseket tudjunk azonosítani. A kérdés megalapozottabb megválaszolásához a saját vizsgálatunkat célszerű lenne kiegészíteni beteg mézelő méh dolgozókból származó adatokkal is. De ha csak a saját és hasonló, egészséges családok bélbakterioma adatai alapján kellene előrejelzést megfogalmazni, akkor úgy gondolom, hogy megfontolandó szempont lenne a diverzitás mértéke. Ökológiai, evolúciós ismereteim szerint a nagyobb diverzitás nagyobb alkalmazkodási képességet jelent a stresszorokkal szemben, amilyenek a kérdésben szereplő patogének is. A mi májusi mintáinkban valamivel nagyobb α -diverzitást tapasztaltunk, a márciusiakhoz viszonyítva. Míg a májusi minták között a környezeti változók (hőmérséklet, csapadék) alapján nem találtunk szignifikáns diverzitásváltozásokat, addig a márciusi minták közül a melegebb területről származók szignifikánsan alacsonyabb értéket mutattak, mint a hűvösebb területről származók. Vagyis gondolhatnánk azt, hogy a márciusban melegebb területeken a kisebb diverzitás jelentheti azt, hogy kitettebbé teszi a méheket különféle kórokozókra. Ha ezt összevetjük

a fonalas vírus abundanciáinkkal, akkor azt látjuk, hogy a márciusi melegebb területről származó mintákban szignifikánsan több a vírus, mint a hidegebb területről származókban. Itt fontos azt is megjegyezni, hogy a márciusi mintákban a szárazabb területről származókban volt magasabb abundancia a csapadékosabb területekhez hasonlítva, míg ugyanebben az összehasonlításban az α -diverzitás nem mutatott szignifikáns eltérést. A diverzitás mellett a bakteriota összetételének stabilitása is fontos szempont lehet, ami alatt itt azt értem, hogy a magbakteriomot alkotó fajok abundanciája nem tér el jelentősen. Ha az erre vonatkozó eredményinket vetjük össze a fonalas vírus előfordulásával, akkor azt látjuk, hogy a mintavételi időszakokon belül, környezeti változók szerint alig látunk szignifikáns változást a magbakteriom fajonkénti abundanciáiban. Míg a két időszak összehasonlítása alapján a fajok nagy része szignifikánsan eltérő abundanciát mutat. Ezek alapján a korlátos adatok alapján a Bíráló kérdésére azt mondanám, hogy olyan periódusok jelenthetnek kockázatot, amelyekben a bélbakteriota diverzitása lecsökken. Ugyanakkor a képet erősen árnyalja, hogy a *Vairimorpha ceranae* előfordulási eredményeink nem kapcsolhatók az α -diverzitási eltérésekhez.

A rendelkezésre álló módszertani és bioinformatikai feltételek mellett mennyire tartja megvalósíthatónak egy metagenom-alapú kullancs-mikrobiom monitoring rendszer bevezetését?

Válasz: A klímaváltozás okán úgy vélem, hogy nem csak megvalósítható, de megvalósítandó is lenne egy ilyen monitoring rendszer kialakítása és működtetése. Csatlakozva a Bíráló egy korábbi észrevételéhez, „vektorokra” kiterjesztve. A megoldott technikai, metodikai témakörök mellett azonban vannak olyanok, amelyek kihívásokat jelentenek, pl. RNS-vírusok metagenom-alapú vizsgálata. Kulcsfontosságú lenne a mintavételezési pontokat, a mintavételezés gyakoriságát kockázatelemzési alapon meghatározni. Véleményem szerint ebben a klimatikus környezet mellett a gazdaállatokra vonatkozó információk felhasználása központi lenne. A vektorközvetítette fertőzések kapcsán fontos, hogy a vektor számára alkalmas környezet álljon rendelkezésre, ahova való eljutása esetén elszaporodhat. Ezen túl további lényeges mozzanat, a megérkezés, vagyis, hogy a vektor hogyan jut egyik helyről a másikra, különösen nagy távolságok esetén. A vektor szállításában számos hordozó szerepelhet, amelyek között a különösen nagy távolságokat bejáró állatok, így pl. a vonuló madarak fontosak lehetnek. Egyes, hazai madárinfluenza kitérő vadmadár vonulási eseményeinek kapcsolata jó példázza ezt. A rendszer tervezésénél érdemes lenne figyelembe venni az 1952-ben felállított országos fénycsapda hálózat tapasztalatait is, illetve ha lehetséges, akkor annak mintáit is felhasználni. Egy ilyen monitoring rendszer az újonnan megjelenő kórokozók detektálása, a már itt lévők elterjedtségének vizsgálata mellett a vektorokkal kapcsolatos új ismeretekkel is szolgálhatna. Erre példaként említhető a kórokozó jelenlétét célzó haltetű metagenomikai vizsgálatunk, amelynek során patogén vírus és baktérium azonosítása mellett az ízeltlábú mitogenomelemzése nyomán sikerült leírunk egy új *Argulus* alfajt (Keve et al., 2025).

*Elképzelése szerint az intracelluláris patogének esetében – mint pl. a *Coxiella burnetii* – az izolátumokban azonosított mobilis rezisztencia gének hogyan járulnak hozzá a horizontális géntranszferhez?*

Válasz: Az obligát intracelluláris kórokozók közül egy nemzetségben (*Anaplasma*) egyáltalán nem, a többiben (*Bartonella*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*) a minták 2,6%-ában azonosítottunk ARG-t. Míg a *Coxiella* minták 11%-a volt ARG-pozitív. Ezek alapján azt gondolhatjuk, hogy a *Coxiella* és a többi nemzetség általunk vizsgált fajai közötti valamilyen alapvető különbség lehet az ARG HGT-ben.

A *C. burnetii* a többi vizsgált baktériumtól alapvetően különbözik abban, hogy nem csak vektorral terjed, hanem pl. levegővel, élelmiszerrel is. Elképzelhető lenne, hogy ezekben a közegekben több ARG-hordozó baktériummal találkozhat, mint a vektoron belül, amelyektől ARG-ket vehet fel. Ennek ellentmond az,

hogy természetes körülmények között a *C. burnetti* nem mutat extracelluláris aktivitást. Ugyanakkor vannak adatok arra vonatkozóan is, hogy speciális mesterséges közegben gazdasejt nélkül is aktivizálható (Omsland et al., 2008). Így az is elképzelhető, hogy, bár kis valószínűséggel ez az extracelluláris aktivitás a gazdán belül ARG-felvételt is lehetővé tesz.

Az viszont jobban adatolt különbség, hogy a *C. burnetti*-ben a többi itt vizsgált intracelluláris kórokozókhoz viszonyítva jelentősen gyakoribb a HGT. Ennek okai között lehet, hogy ez a faj még kevésbé régóta obligát intracelluláris baktérium, kisebb mértékben csökkent a genomja (2 Mb), több az önálló élethez szükséges eszköz áll rendelkezésére (Minnick & Raghavan, 2011). A *Bartonella*-k 1.9 Mb genomja mellett a *C. burnetti*-nél kevésbé jellemző a HGT (Québatte & Dehio, 2019). Összevetve ezt a HGT-ben jóval ritkábban résztvevő (Darby et al., 2007) Rickettsiales fajok 1,1-1,6 Mb méretű genomjával, feltételezhető, hogy ezek HGT-t szolgáló génállománya jelentősen kisebb.

Ezeket a szempontokat figyelembe véve úgy képelem, hogy az általunk elemzett intracelluláris kórokozók közül elsősorban a *C. burnetti*-ben előforduló mobilis ARG adódhatnak át HGT-vel.

Végezetül ismételtlen köszönöm Dr. Szmolka Annamáriának tárgyilagos, világosan megfogalmazott kritikai észrevételeit és kérdéseit, valamint hogy megállapításaimat összességében hiteles és új eredményeknek ismerte el. Kérem, hogy opponensi véleményére és kérdéseire adott válaszaimat szíveskedjék elfogadni.

Budapest, 2026. augusztus 5.



Solymosi Norbert

Hivatkozások

- Darby, A. C., Cho, N.-H., Fuxelius, H.-H., Westberg, J., & Andersson, S. G. (2007). Intracellular pathogens go extreme: genome evolution in the Rickettsiales. *TRENDS in Genetics*, 23(10), 511.
- Dee, D. P., Uppala, S. M., Simmons, A. J., Berrisford, P., Poli, P., Kobayashi, S., Andrae, U., Balmaseda, M. A., & et al. (2011). The ERA-Interim reanalysis: configuration and performance of the data assimilation system. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society*, 137, 553–597.
- Estrada-Peña, A., Mihalca, A. D., & Petney, T. N. (2018). *Ticks of Europe and North Africa: a guide to species identification*. Springer.
- Keve, G., Tóth, A. G., Katics, M., Baska, F., Eszterbauer, E., Hornok, S., Németh, T., & Solymosi, N. (2025). First record of *Argulus japonicus* infestation on *Cyprinus carpio* in Hungary, and the first description of *Argulus japonicus europaeus* subsp. nov. Keve, 2025. *Parasites & Vectors*, 18(1), 480.
- Kincaid, T. M., Olsen, A. R., & Weber, M. H. (2019). *spsurvey: Spatial survey design and analysis*.
- Minnick, M. F. & Raghavan, R. (2011). Genetics of *Coxiella burnetii*: on the path of specialization. *Future microbiology*, 6(11), 1297.
- Omsland, A., Cockrell, D. C., Fischer, E. R., & Heinzen, R. A. (2008). Sustained axenic metabolic activity by the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Journal of Bacteriology*, 190(9), 3203.
- Québatte, M. & Dehio, C. (2019). *Bartonella* gene transfer agent: Evolution, function, and proposed role in host adaptation. *Cellular Microbiology*, 21(11), e13068.
- R Core Team (2018). *R: A Language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.