

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A METHICILLIN-REZISZTENS
STAPHYLOCOCCUS AUREUS FERTŐZÖTTség
VIZSGÁLATA HASZONÁLLATOKBAN ÉS
ÉLELMISZEREKben MALDI-TOF MS
TECHNIKA ALKALMAZÁSÁVAL**

Horváth Brigitta

Témavezetők: Dr. Peles Ferenc Árpád, *Ph.D.*
adjunktus

Dr. Micsinai Adrienn, *Ph.D.*
WESSLING Hungary Kft. projekt menedzser



DEBRECENI EGYETEM
Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2021

1. DOKTORI ÉRTEKEZÉS ELŐZMÉNYEI ÉS CÉLKITŰZÉSEI

Az antimikrobiális szerek használata több szempontból is forradalmasította az orvostudományt, azonban alkalmazásukat évtizedek óta kíséri az antibiotikum rezisztens baktériumok megjelenése, melyek globális egészségügyi problémát okoznak. A kórokozók multirezisztens formái, többek között az intenzív állattartásban alkalmazott nagy mennyiségű antibiotikumok hatására, egyre növekvő állat-egészségügyi problémát jelentenek, melyek érintkezés, az élelmiszerlánc és a környezet révén az állatokról az emberekre terjedhetnek. A multirezisztens kórokozók által kiváltott fertőzések terápiás lehetőségei egyre korlátozottabbak, ezért csökkentenünk kell az antibiotikumok szakszerűtlen alkalmazását, hogy megőrizzék hatékonyságukat a gyógyászatban (WHO, 2017).

Az antibiotikum rezisztens kórokozók közül a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) fertőzések incidenciája változatosan alakul a különböző országokban, azonban Európában még mindig az egyik leggyakoribb oka a súlyos bakteriális fertőzéseknek. Napjainkban, a rezisztenciát hordozó *S. aureus* fajok már nem csak az egészségügyben (HA-MRSA) és a közösségekben (CA-MRSA), hanem az állattartásban (LA-MRSA), ezáltal az állati eredetű élelmiszerekben is egyaránt előfordulnak. Az izolátumok molekuláris tipizálási eredményei rámutattak arra, hogy az élelmiszerláncban az MRSA számos típusa jelen van a különböző országokban, azonban az állatállományhoz köthető és az élelmiszerekben előforduló MRSA törzsek ellenőrzése jelenleg önkéntes. Az MRSA törzsek epidemiológiai és evolúciós nyomonkövetésének azonban nagy jelentősége van mind élelmiszerbiztonsági, mind népegészségügyi szempontból (EFSA, 2009; ECDC, 2019).

Magyarországon, ahogy az Európai Unióban is, a koaguláz-pozitív *Staphylococcus* fajok számának meghatározását egyes élelmiszerekben rendelet írja elő, azonban az előírt szabvány nem teszi lehetővé az identifikálást és nem tér ki az antibiotikum rezisztencia feltérképezésére. A mátrix-asszisztált lézer deszorpciós ionforrás és repülési idő tömeg analízátor összekapcsolásán alapuló tömegspektrometriás módszer, a MALDI-TOF MS technika, egy új diagnosztikai lehetőséget nyújt a mikrobiológiában. A vizsgált minta makromolekuláiról és fehérjeprofiljáról szolgáltat információt, mely egyfelől a taxonómiai pozíció meghatározásának alapja, másfelől az MRSA és az MSSA (methicillin-szenzitív *Staphylococcus aureus*) izolátumok elkülönítésének kiindulási pontja is.

1.1. Célkitűzések

A WESSLING Hungary Kft. Élelmiszervizsgáló Mikrobiológiai laboratóriumába évente közel 5000 élelmiszer minta érkezik a koaguláz-pozitív *Staphylococcus* fajok számának meghatározására. Azonban, az erre a célra rendeletben előírt, MSZ EN ISO 6888-1:2008 szabvány nem teszi lehetővé a fajok, alfajok azonosítását, elkülönítését valamint az antibiotikum rezisztencia meghatározását. Az állattenyésztésben és állatgyógyászatban is kiemelkedő jelentőséggel bíró fajok és alfajok azonosítása és elkülönítése, az eltérő mértékű virulencia és patogenitás miatt nem elhanyagolható, népegészségügyi szempontból pedig elengedhetetlen az antibiotikum-rezisztencia feltérképezése. Munkám során élelmiszerekből és haszonállatokból izolált *S. aureus* fajok fehérjealapú és molekuláris biológiai vizsgálatát tűztem ki célul:

- MALDI-TOF MS technika minta-előkészítési módszerek összehasonlítása és kidolgozása a kapott tömegspektrumok paramétereinek optimalizálása céljából.
- Az alkalmazott táptalajok és tenyésztési idő valamint a mátrix oldatok tömegspektrumok paramétereire gyakorolt hatásainak vizsgálata.
- Az *S. aureus* fajok, alfajok biztonságos azonosítása MALDI Biotyper szoftver segítségével.
- Specifikus csúcsok meghatározása, melyek alkalmasak a „*Staphylococcus aureus* klonális komplex” fajainak elkülönítésére.
- Methicillin-rezisztencia specifikus csúcsok meghatározása, melyek alkalmasak az MRSA és MSSA törzsek elkülönítésére.
- Adatok szolgáltatása az állati eredetű élelmiszerek MRSA fertőzőittségének felderítésére.
- Az élelmiszerekből izolált törzsekben a *Staphylococcus* enterotoxin gének feltérképezése.
- Az izolátumok *spa* és MLST tipizálása a törzsek epidemiológiai jelentősége, valamint a revízió céljából.
- Összefüggések feltárása, a MALDI-TOF MS technika során kapott markerszettek és a molekuláris biológiai tipizálással jellemzett MRSA törzsek között.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. *A koaguláz-pozitív Staphylococcus fajok azonosítása*

A koaguláz-pozitív *Staphylococcus* fajokat az MSZ EN ISO 6888-1:2008 szabvány módszerei alapján határoztam meg, melyet latex agglutinációs (PASTOREX™ STAPH-PLUS) gyorseszt elvégzésével erősítettem meg.

2.2. *A vizsgált Staphylococcus aureus törzsek*

Referencia törzsek: A MALDI-TOF MS vizsgálat minta-előkészítési módszerének kidolgozásához 6 db methicillin-szenzitív *S. aureus* (ATCC 29213, ATCC 6538, ATCC 14458, ATCC 19095, ATCC 27664), 1 db *S. argenteus* (DSM 28299^T), 1db *S. schweitzeri* (DSM 28300^T) és 2 db methicillin-rezisztens *S. aureus* (ATCC 33591, ATCC 43300) törzset használtam. A szekvencia alapú tipizálás során továbbá a DSMZ 20231 *S. aureus* referencia törzset alkalmaztam.

Humán izolátumok: A vizsgálatokba 6 orrváladékból és 2 sebváladékból izolált *S. aureus* törzset is bevontam, melyet a MikroMikoMed Kft. házi törzsgyűjteményéből biztosított számomra.

Haszonállatokból izolált törzsek: A vizsgálatba bevont 13 haszonállatból izolált MRSA törzset, az Állatorvostudományi Egyetem Lógyógyászati Tanszék és Klinika házi törzsgyűjteményéből biztosította számomra.

Élelmiszerekből izolált törzsek: A vizsgálat során 647 élelmiszer mintából 58 koaguláz-pozitív *Staphylococcus* törzset azonosítottam, amelyből 47 izolátum bizonyult *S. aureus* törzsnek.

2.3. *MALDI-TOF MS vizsgálat*

2.3.1. Alkalmazott minta-előkészítési eljárások

Etanolos extrakció (EtOH-FA): 300 µl ioncserélt vizet pipettáztam egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe. Néhány tized milligramm mintát intenzív keveréssel az ioncserélt vízben elszuszpendáltam. Ezután hozzámértem 900 µl abszolút etanolt. Vortexen megkevertem, majd lecentrifugáltam (13000 rpm, 3 perc). A felülúszót leöntöttem és hagytam az oldószer

maradékot elpárologni. A mintához hozzámértem 20 µl 70%-os hangyasavat és hagytam állni 2 percig. Ezután 20 µl acetonitrilt adtam a mintához, megkevertem, majd lecentrifugáltam (13000 rpm, 3 perc). Az oldat felülúszójából a mintatartó lemez egyik pozíciójára 1 µl-t cseppentettem fel. Az oldószer elpárologása után közvetlenül 1 µl mátrix oldatot cseppentettem a mintára és lamináris boksiban hagytam beszáradni a mintát (Bruker Daltonik GmbH, 2013a).

Direkt mintafelvétel hangyasavval (DT-FA): Néhány tized milligramm biológiai mintát az előkészített mintatartó lemez egyik pozíciójára kentem fel. A felkent mintákra 1 µl 70%-os hangyasavat cseppentettem és lamináris boksiban hagytam beszáradni. Ezután 1 µl mátrix oldatot pipettáztam a mintákra (Bruker Daltonik GmbH, 2013a).

Direkt mintafelvétel (DT): Néhány tized milligramm biológiai mintát. Ezt közvetlenül az előkészített mintatartó lemez egyik pozíciójára kentem fel. 1 µl mátrix oldatot cseppentettem a mintára és lamináris boksiban hagytam elpárologni az oldószert, beszáradni a mintát (Bruker Daltonik GmbH, 2013b).

2.3.2. MALDI-TOF MS mérési paraméterei

A vizsgálati paraméterek beállítását, a módszer fájlok aktiválását, a kalibrációt a **FlexControl** szoftver (Bruker Daltonik GmbH) segítségével végeztem el. Automatikus spektrum felvételi módban vettem fel a tömegspektrumokat, lehetőség szerint 200-500 lézerlövés átlagából. Simítás és alapvonal korrekció után elvégeztem a kalibrációt a referencia tömegszámok azonosítása alapján. A kalibráció során a tömegszámok eltérése nem haladhatta meg a 300 ppm értéket. Ezt követően elmentettem a módszerfájlt és elindítottam automatikus spektrumfelvételi módban a minták mérését, 2-20 kDa tömegtartományban.

2.3.3. Tömegspektrumok értékelése

Az izolátumok azonosítása során, a **MALDI BioTyper 2.0** szoftvert (Bruker Daltonik, GmbH) alkalmaztam. A szoftver lehetővé tette a kapott tömegspektrumok és a könyvtárban található referencia spektrumok összehasonlítását. Amennyiben az azonosítási *log score* érték nagyobb 2,300-nél, akkor igen valószínű az azonosság a vizsgált mikroorganizmus és a referencia spektrumkönyvtárban található mikroorganizmus között, tehát azonosítottnak tekintjük a fajt. 2,000 – 2,299 közötti *log score* érték esetén, az azonosság kisebb, ebben az esetben a mikroorganizmus nemzetségét tekintjük csak azonosítottnak. 1,700 – 1,999 log

score érték között már nem tekinthető megfelelően biztosnak a nemzetség (genus) azonosítása sem. 0,000 - 1,699 log score érték között pedig sikertelen a mikroorganizmus azonosítása.

A spektrumok vizsgálatához a **FlexAnalysis 3.4** szoftvert (Bruker Daltonik, GmbH) alkalmaztam, amely lehetővé teszi a felvett spektrumok kalibrálását valamint részletes elemzését. A vizsgálat során a kapott tömegspektrumok simítását a Savitzky–Golay szűrővel, az alapvonal korrekcióját pedig a TopHat algoritmussal végeztem el.

A **FlexAnalysis 3.4** szoftver lehetővé teszi a csúcsok tömegszámainak valamint azok paramétereinek exportálását **Microsoft Office Excel 2007** programba, ezáltal statisztikai módszerekkel is elemezhetővé váltak a felvett spektrumok.

A minta-előkészítések, mátrix oldatok, alkalmazott táptalajok és tenyésztési idő hatását a spektrumok mérhető paramétereire, mint spektrumot alkotó csúcsok számának átlaga és az azonosítási *log score* értékek átlaga, **SPSS 16.0** statisztikai programban egy tényezős varianciaanalízissel, Tukey teszttel elemeztem mely során 5%-os szignifikancia szintet határoztam meg.

2.4. S. aureus törzsek methicillin-rezisztenciájának meghatározása

2.4.1. Tenyésztésen alapuló módszerek

A **korongdiffúziós módszer** során a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) által meghatározott előírásoknak (2019) megfelelően vizsgáltam a törzsek antibiotikum-rezisztenciáját. Cefoxitin 30 µg korongokat alkalmaztam a vizsgálat során, az előírások alapján, MRSA törzsek esetében a feltisztulási zóna 6-19 mm.

A **CHROMagar MRSAII egy szelektív differenciáló táptalaj**, mely a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* fajok kimutatására szolgál. MRSA baktériumnak azokat a törzseket tekintettem, melyek mályvaszínű és morfológiailag *Staphylococcus*okhoz hasonló telepeket képeztek.

2.4.2. A *mecA* génkomplex vizsgálata

A vizsgálatot a Nemzeti Élelmiszertudományi Intézet (National Food Institute – NFI) 2012-ben kiadott protokollja alapján végeztem. A baktériumból genomi DNS-t izoláltam, majd PCR segítségével felszaporítottam a *mecA* génszakaszt. Az adott primerpárral kapott *mecA* génszakasz mérete 527 bp hosszú (1. táblázat).

1. táblázat: A *mecA* génszakasz felszaporításához használt PCR primerek

Primer név	Primer szekvencia
mecA_fwd	5'- GGGATCATAGCGTCATTATTC-3'
mecA_rev	5'- AACGATTGTGACACGATAGCC-3'

2.5. Szekvencia alapú tipizálási módszerek

2.5.1. *spa* tipizálás

A baktériumból genomi DNS-t izoláltam, majd PCR segítségével felszaporítottam a *Staphylococcus aureus* protein A génszakaszt (*spa*). A Nemzeti Élelmiszertudományi Intézet (National Food Institute – NFI) 2012-ben kiadott protokollja alapján végeztem az eljárást. A *Staphylococcus aureus* protein A génszakasz felszaporításához a 2. táblázatban látható primerpárt használtam.

2. táblázat: A *Staphylococcus aureus* protein A génszakasz felszaporításához használt PCR primerek

Primer név	Primer szekvencia
spa-1113F	5'-TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC-3'
spa-1514R	5'-CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT-3'

A nukleotid sorrend meghatározását mindkét irányból, azaz a forward és a reverz primerrel külön-külön is elvégeztem. A szekvencia eredmények értékelése és az *spa* típusok azonosítása **BioNumerics 7.6** szoftver segítségével történt. A szekvencia illesztések ellenőrzését elvégeztem, majd elemeztem az ismétlődések alapján beazonosítható *spa* típusokat.

2.5.2. MLST vizsgálat

A baktériumból genomi DNS-t izoláltam, majd felszaporítottuk a 7 db *Staphylococcus aureus* fajra specifikus génszakaszt PCR segítségével. A megtisztított PCR termékek nukleotid sorrendjét meghatároztam és a szekvencia adatok értékelését *BioNumerics 7.6* szoftver segítségével végeztem el. A szoftver azonosította a PubMLST adatbázisban meghatározott gén szakaszhatárokat és a mintához hozzárendelte a szekvencia típust és allél verziószámokat. Az eljárás THOMAS és mtsai. (2007) tanulmánya alapján került

kidolgozásra. A *Staphylococcus aureus* törzsekre kifejlesztett 7 db háztartási gént és a gének felszaporításához használt primerek szekvenciáit a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat: A *Staphylococcus aureus* fajra kidolgozott MLST módszerben alkalmazott gének és a felszaporításukhoz használt primerek adatai (<https://pubmlst.org/saureus/>)

Vizsgált gén és rövidítése	Primer név	Primer nukleotid sorrend (5'-3')
<i>Karbamát kináz (arcC)</i>	arc up_1	TTG ATT CAC CAG CGC GTA TTG TC
	arc dn_2	AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG
<i>Sikiminsav dehidrogenáz (aroE)</i>	aro up_3	ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC
	aro dn_4	GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC
<i>Glicerol kináz (glpF)</i>	glp up_5	CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C
	glp dn_6	TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC
<i>Guanilát kináz (gmk)</i>	gmk up_7	ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC
	gmk dn_8	TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA
<i>Foszfát acetiltranszferáz (pta)</i>	pta up_9	GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG
	pta dn_10	GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA
<i>Triózfoszfát izomeráz (tpi)</i>	tpi up_11	TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA
	tpi dn_12	TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC
<i>Acetil-koenzim-A acetiltranszferáz (yqiL)</i>	yqi up_13	CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC
	yqi dn_14	CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC

2.6. Enterotoxinokat kódoló gének vizsgálata

A törzsekből a genomiális DNS-t izoláltam, majd az SE gének (*sea*, *seb*, *see*, *sed*, *sec*, *ser*, *seh*, *selj*, *seg*, *sei*, *selp*) detektálására multiplex PCR protokollokat hajtottam végre az Európai Unió Koaguláz-Pozitív *Staphylococcusok* Referencialaboratóriumának (EU-RL CPS) primerkészleteivel. A *seh* és a *ser* géneket detektáló primereket harmadik, különálló reakcióként futtattam, hogy elkerüljem a hasonló méretű PCR termékek átfedését a gélelektroforézis során. Az amplikonokat agaróz gélelektroforézissel választottam el, és becsült méretük alapján azonosítottam az egyes gének jelenlétét vagy hiányát.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Minta-előkészítési módszerek kidolgozása MALDI-TOF MS vizsgálatokhoz

A minta-előkészítési eljárások összehasonlítása és kiválasztása során a legfontosabb tényező, amit figyelembe vettem, a spektrumokat alkotó csúcsok száma, a teljes spektrum intenzitása és a detektált legkisebb és legnagyobb m/z értékű csúcs. A referencia törzseket Columbia véres agaron tenyésztettem 24 órán keresztül és α -HCCA mátrixot alkalmaztam melyet előző tanulmányok eredményeire alapoztam (JOSTEN és mtsai., 2013). A tömegspektrumok manuális elemzése az előkísérletekben rámutatott arra, hogy szükség van egy olyan minta-előkészítési eljárás kidolgozására, mely során hasonló felbontású és intenzitású spektrumokat tudok felvenni, mint az etanolos extrakcióval, azonban sokkal rövidebb idő alatt és kevesebb lépésben.

Egy módosított hangyasavas szuszpendálási eljárást dolgoztam ki, mely (M-FA) során egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe 20 μ l 70%-os hangyasavat pipettáztam. A vizsgálandó tenyészetből egy steril kaccsal vettem néhány milligramm biológiai mintát, melyet elszuszpendáltam 20 μ l 70%-os hangyasavban 45 másodpercen keresztül. A szuszpenzióhoz hozzáadtam 20 μ l acetonitrilt és jól megkevertem. Ezt követően az előkészített mintatartó lemez egyik pozíciójára 1 μ l-t cseppentettem fel az oldatból. Minden mérés esetében 6 párhuzamos mintafelvitelt alkalmaztam. A beszáradt mintára 1 μ l mátrix oldatot cseppentettem fel és lamináris bokszban hagytam beszáradni.

A 4 eljárás közül a direkt mintafelvitel (DT) esetében detektáltam a legkevesebb csúcsot. Hangyasavas feltárással (DT-FA) kiegészítve már kedvezőbb számú (78 db) csúcs jelent meg a spektrumban. Etanolos extrakcióval (EtOH) detektáltam a legtöbb csúcsot (119 db), azonban a módosított hangyasavas szuszpendálás (M-FA) során is 100 db felett volt a detektálható csúcsok száma (4. táblázat).

4. táblázat: A minta-előkészítési eljárások hatása a spektrumok paramétereire

Vizsgált paraméter	Minta-előkészítési eljárások			
	DT	DT-FA	EtOH	M-FA
Detektált csúcsok számának átlaga, szórása (db)	67 (1,51)	78 (1,13)	119 (2,51)	104 (1,66)
Spektrumok intenzitása (a.u.)	10^4	10^4	10^5	10^4
Tömegszám tartomány (m/z)	1901-15051	1901-15051	2090-15051	1901-19084

A spektrumok intenzitása hasonlóképpen alakult a különböző minta-előkészítési eljárások során. A DT, DT-FA, M-FA esetében a spektrumok intenzitása 10^4 a.u.volt. EtOH extrakcióval magasabb intenzitást tudtam elérni, azonban ebben az esetben a legkisebb detektálható m/z csúcs nagyobb volt (2090 m/z), mint a másik 3 eljárás esetében. A legnagyobb tömegszám tartományt a M-FA eljárással értem el, ebben az esetben a legkisebb detektálható csúcs 1901 m/z értékű volt, míg a legnagyobb 19084 m/z. 15000 m/z érték felett csak ezzel a minta-előkészítéssel detektáltam csúcsokat.

A minta-előkészítési módszerek összehasonlítása során, végül mind a 4 eljárással elvégeztem a referencia *S. aureus* törzsek MALDI Biotyper azonosítását. A legalacsonyabb azonosítási átlag log score értékeket a DT eljárással kaptam. Továbbá a DT-FA eljárással is csak 2,203 volt a törzsek átlag azonosítási log score értéke. Az EtOH és M-FA minta-előkészítési módszerekkel, a törzsek átlag azonosítási log score értéke nagyobb volt, mint 2,300, tehát a mikroorganizmusok azonosítása biztonságosnak tekinthető. A különböző minta-előkészítési eljárásokkal kapott átlag azonosítási log score értékek között, az M-FA és EtOH módszer esetében nem volt szignifikáns különbség. Azonban az M-FA minta-előkészítési módszer egy gyorsabb eljárás, mely az EtOH módszerhez hasonlóan lehetővé teszi a fajok, alfajok biztonságos elkülönítését, valamint a spektrum intenzitása és a csúcsok száma alapján a részletes elemzést.

3.2. Mátrix oldatok összehasonlítása

A minta-előkészítési módszer kiválasztását követően, a mátrix oldatok spektrumokra gyakorolt hatását elemeztem. A tenyésztési körülmények megegyeztek az előző 3.1. alfejezetben leírtakkal. Az α -HCCA mátrix oldat mellé további 2 mátrix oldatot vontam be a vizsgálatokba, az SA-t és a DHB-t.

5. táblázat: A mátrix oldatok hatása a spektrumok paramétereire

Vizsgált paraméter	Alkalmazott mátrix oldatok		
	SA	DHB	α -HCCA
Detektálható csúcsok számának átlaga, szórása (db)	98 (1,87)	86 (2,78)	104 (1,66)
Spektrumok intenzitása (a.u.)	3×10^3	1×10^4	1×10^4
Tömegszám tartomány (m/z)	1827- 9627	1901-15051	1901-19084

Az SA mátrix a nagyobb tömegű fehérjék detektálását teszi lehetővé, azonban az eredmények alapján ezzel a mátrix oldattal tudtam a legkisebb tömegszám tartományban csúcsokat detektálni. Ebben az esetben a legnagyobb, detektálható fehérje a 9627 m/z értékű csúcs volt. A DHB mátrix lehetővé tette a csúcsok detektálását 1901-15051 m/z tartományban, de a megjelölt csúcsok számának átlaga 100 db alatt volt. A spektrumok intenzitását tekintve, a DHB és α -HCCA mátrix oldat megfelelt az elvárásoknak, azonban az SA mátrix alkalmazásával a spektrumok átlag intenzitása mindössze 3000 volt.

3.3. Táptalajok és a tenyésztési idő összehasonlítása

A vizsgálatok során elemeztem a 4 különböző táptalajon tenyésztett referencia törzsek spektrumait. A Baird-Parker (BP) szelektív táptalajon tenyésztett törzsek spektrumaiban a detektálható csúcsok számának átlaga 62 db volt, mely jelentősen kevesebb volt a másik 3 esethez viszonyítva (6. táblázat). A Mueller-Hinton (MH) csokoládé (CS) és Columbia (C) véres agaron való tenyésztés során, a detektálható csúcsok számának átlaga között nem volt szignifikáns különbség.

6. táblázat: Az alkalmazott táptalajok hatása a spektrumok paramétereire

Vizsgált paraméter	Alkalmazott táptalajok			
	BP	MH	CS	C
Detektálható csúcsok számának átlaga, szórása (db)	62 (2,45)	98 (3,00)	102 (2,69)	104 (1,66)
Spektrumok intenzitása (a.u.)	3×10^3	6×10^3	8×10^3	1×10^4
Tömegszám tartomány (m/z)	1901-19084	1901-19084	1901-19084	1901-19084

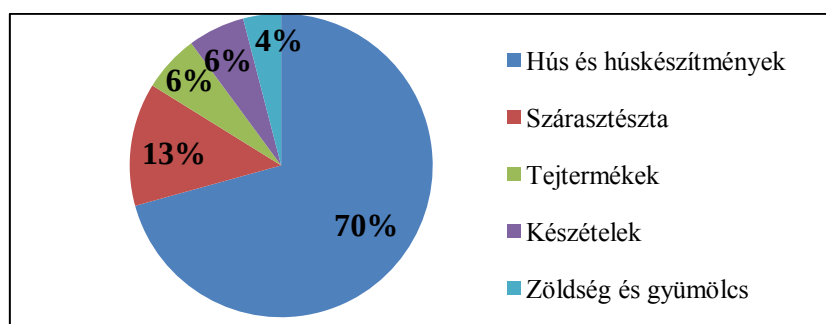
A táptalaj kiválasztását követően, a tenyésztési idő spektrumokra gyakorolt hatásait vizsgáltam. Columbia véres agaron 24, 48 és 72 óráig inkubáltam 37 °C-on a törzseket. A 24 h és a 48 h tenyésztési időt követően a detektálható csúcsok száma között nem volt szignifikáns különbség (7. táblázat). A 72 h tenyésztési időt követően lecsökkent a detektálható csúcsok száma, ami legfőképp a 1900-4306 m/z, valamint a 9627-19084 m/z tömegszám tartomány között volt jellemző. A vizsgált paraméterek alapján a további mérések esetében a 24 h tenyésztési időt alkalmaztam.

7. táblázat: A tenyésztési idő hatása a spektrumok paramétereire

Vizsgált paraméter	Tenyésztési idő		
	24 h	48 h	72 h
Detektálható csúcsok számának átlaga (db)	104 (1,72)	102 (1,89)	76 (1,81)
Spektrumok intenzitása (a.u.)	1×10^4	1×10^4	1×10^4
Tömegszám tartomány (m/z)	1901-19084	1901-15051	1901-19084

3.4. Izolátumok azonosítása MALDI Biotyper szoftverrel

Az élelmiszerekből és haszonállatokból izolált koaguláz-pozitív törzsek faj és alfaj szintű azonosítását MALDI Biotyper szoftver segítségével végeztem. Minden izolátumot 2,300 log score érték felett azonosítottam, melynek az 56%-a meghaladta a 2,400 log score értéket. A vizsgálat során 5 különböző élelmiszercsoportból azonosítottam *S. aureus* törzseket, melyek 70%-át hús és húskészítményekből, 13%-át száraztésztaiból izoláltuk (1. ábra).



1. ábra Az élelmiszerekből izolált *S. aureus* törzsek megoszlása élelmiszercsoportonként

A haszonállatokból izolált *S. aureus* törzsek azonosítását is elvégeztem MALDI Biotyper program segítségével. Minden izolátumot 2,400 log score érték felett azonosítottam és a törzsek 77%-a a *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* DSM 799 referencia törzs tömegspektrumával mutatta a legnagyobb hasonlóságot (8. táblázat).

PÉREZ-SANCHO és mtsai. (2018) tanulmánya alapján, a *S. aureus* subsp. *anaerobius* esetében a 3430 m/z és a 6861 m/z az alfajra specifikus csúcs. Az azonosítást követően, FlexAnalysis 3.4 program segítségével manuálisan is elemeztem az izolátumok tömegspektrumait, amely során kizárhattuk a két specifikus csúcs jelenlétét.

8. táblázat: Haszonállatokból izolált törzsek azonosítási eredményei

Azonosító	Faj	Log score érték	Azonosítás eredménye
SA-127	sz.marha	2,453	1
SA-146	sz.marha	2,534	1
SA-297	ló	2,467	1
SA-136	sertés	2,543	1
SA-237	sz.marha	2,465	1
SA-034	sertés	2,467	1
SA-113	sertés	2,474	1
SA-126	sertés	2,408	3
SA-116	sz.marha	2,483	2
SA-121	sz.marha	2,526	2
SA-145	sz.marha	2,488	1
SA-329	ló	2,517	1
SA-065	sertés	2,462	1

1: *Staphylococcus aureus* subsp *aureus* DSM 799; 2: *Staphylococcus aureus* subsp *aureus* DSM 20231T DSM;
3: *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 THL

3.5. A „*S. aureus* komplex” fajainak elkülönítése MALDI-TOF MS technikával

Korábbi tanulmányokban számos olyan specifikus csúcsot határoztak meg, melyek alkalmasak lehetnek a *S. aureus*, *S. argenteus* és *S. schweitzeri* azonosítására és elkülönítésére. A vizsgálat során JOSTEN és mtsai. (2013) és SCHUSTER és mtsai. (2017) által meghatározott 29 specifikus csúcsot teszteltem a referencia törzseken (9. táblázat). A 29 csúcs közül 8 csúcs (6889 m/z, 10105 m/z, 5045 m/z, 5002 m/z, 6580 m/z, 2289 m/z, 6613 m/z, 3007 m/z) eltérő fajban/fajokban jelent meg az előző tanulmányokban leírt eredményekhez viszonyítva.

9. táblázat: Specifikus csúcsok megjelenése a *S. aureus* klonális komplex fajainak tömegspektrumaiban

Faj	m/z
<i>S. aureus</i> / <i>S. argenteus</i> / <i>S. schweitzeri</i>	2636, 3891, 4306, 4814, 6354, 6889*, 8091, 8891, 9627
<i>S. aureus</i> / <i>S. argenteus</i>	10105*, 3037
<i>S. aureus</i> / <i>S. schweitzeri</i>	5045*, 6613*
<i>S. argenteus</i>	5002*, 6580*
<i>S.aureus</i>	2201, 2289*, 2307, 2685, 3007*, 3875, 4485, 4497, 5507, 5525, 5539, 5551, 6423, 6552

*Csúcsok, amelyek más faj tömegspektrumában jelentek meg az előző tanulmányokhoz viszonyítva.

A referencia törzsek tömegspektrumainak további elemzésével meghatároztam 8 olyan specifikus csúcsot, melyek lehetővé teszik a fajok elkülönítését és azonosítását (10. táblázat). Az élelmiszerekből és a haszonállatokból izolált törzsek tömegspektrumaiban egyik *S. argenteus* és *S. schweitzeri* specifikus csúcsot sem detektáltam.

10. táblázat: Új specifikus csúcsok a *S. aureus* komplex fajainak elkülönítésére

Faj	m/z
<i>S. argenteus</i> / <i>S. schweitzeri</i>	2641
<i>S. schweitzeri</i>	3453
<i>S. schweitzeri</i>	4911
<i>S. aureus</i> / <i>S. argenteus</i>	4942
<i>S. aureus</i>	5032
<i>S. argenteus</i> / <i>S. schweitzeri</i>	5286
<i>S. aureus</i> / <i>S. argenteus</i>	6818
<i>S. schweitzeri</i>	6908

3.6. Methicillin-rezisztencia meghatározása MALDI-TOF MS technikával

A methicillin-rezisztencia specifikus csúcsok meghatározását valamint az előző tanulmányokban megállapított csúcsok tesztelését először a referencia törzseken végeztem el. A vizsgálat során, az előző tanulmányokban meghatározott 10 különböző MRSA specifikus csúcsot teszteltem, a referencia MSSA és MRSA törzseken (11. táblázat).

11. táblázat: A referencia törzsekben detektálható MRSA specifikus csúcsok

(m/z)	Referencia Törzsek						
	MRSA		MSSA				
	ATCC33591	ATCC43300	ATCC29213	ATCC6538	ATCC14458	ATCC19095	ATCC27664
2127	+	-	-	-	-	-	-
2414	+	+	-	-	-	-	-
3043	+	+	+	+	+	+	+
4607	-	-	-	-	-	-	-
5070	+	-	-	-	+	-	-
6576	+	+	-	+	+	-	+
6885	+	-	-	-	-	-	-
9216	-	-	-	-	-	-	-
9632	+	+	+	+	+	+	+
10152	-	+	-	-	-	-	-

A tesztelt csúcsok közül a 2414 m/z, a 6885 m/z és a 10152 m/z értékű csúcs volt az, amelyeket csak az MRSA törzsekben detektáltam és az MSSA törzsekben nem jelentek meg.

Az általam meghatározott specifikus csúcsokat (12. táblázat, *-al jelölt m/z értékek), a referencia törzsek spektrumainak elemzése során határoztam meg, melyeket a haszonállatok és a klinikai MRSA izolátumok spektrumain teszteltem.

3.7. Az élelmiszerekből izolált S. aureus törzsek methicillin-rezisztenciájának feltérképezése

3.7.1. MRSA specifikus csúcsok vizsgálata az élelmiszerekből izolált törzsek tömegspektrumaiban

Az élelmiszerekből izolált törzsek tömegspektrumainak elemzése során az MRSA specifikus csúcsok jelenlétét, illetve hiányát vizsgáltam. A spektrumok elemzése során egy sertéstárjából és egy libamájból izolált törzs bizonyult methicillin-rezisztensnek.

12. táblázat: Az MRSA specifikus csúcsok előfordulási gyakorisága az élelmiszerekből izolált törzsek tömegspektrumaiban

MRSA specifikus csúcsok (m/z)	Előfordulási gyakoriság (%)	
	Élelmiszerekből izolált MSSA törzsek (n=45)	Élelmiszerekből izolált MRSA törzs (n=2)
2127	0	100
2414	0	100
3043	53	100
4607	0	0
5070	62	100
6576	71	100
6885	0	100
9216	0	0
9632	97	100
10152	0	50
2453*	0	100
4461*	46	100
2548*	80	50
2718*	0	100
3885*	0	0

*A referencia törzsek alapján meghatározott, új methicillin-rezisztencia specifikus csúcsok

3.7.2. Korongdiffúziós módszer és az MRSA CHROMagar szelektív, differenciáló táptalaj vizsgálati eredményei

Az élelmiszerekből izolált törzsek esetében korongdiffúziós módszerrel és MRSA szelektív differenciáló táptalajjal is igazoltam az antibiotikum rezisztencia jelenlétét. Minden izolált törzs esetében párhuzamos mérést végeztem, valamint a referencia MSSA és MRSA törzseken is elvégeztem a vizsgálatot.

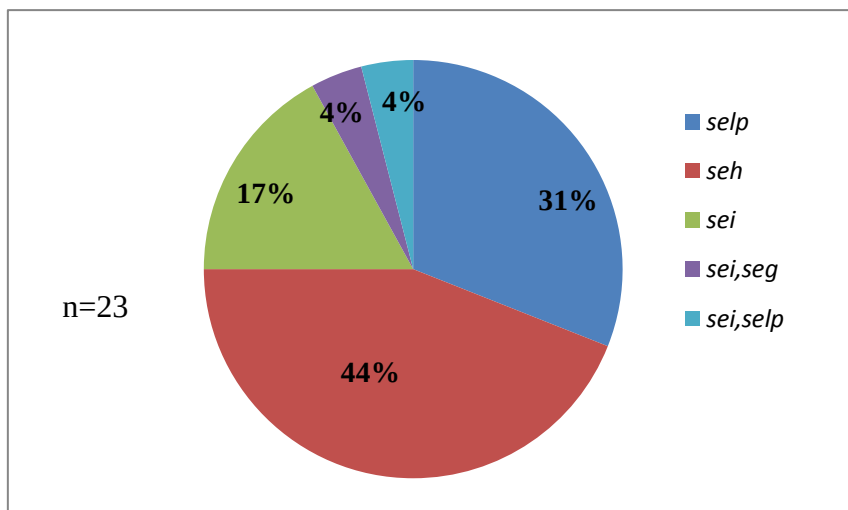
A korongdiffúziós módszer esetében, 45 törzsnek 23-29 mm közé esett a feltisztulási zónája. A libamájból izolált törzs feltisztulási zónája 9 mm volt, a sertéstarjából izolált törzs feltisztulási zónája pedig 17 mm volt, tehát a korongdiffúziós módszer alapján is methicillin-rezisztensnek bizonyult mind a két *S. aureus* törzs. A libamájból és a sertéstarjából izolált törzs mályvaszínű telepeket képeztek az MRSA CHROMagar táptalajon, a referencia MSSA törzsek és a többi élelmiszerből izolált törzs esetében azonban nem volt megfigyelhető telep.

3.7.3. A *mecA* gén tipizálás eredményei

Az MRSA szelektív, differenciáló táptalaj, a korongdiffúziós módszer és a MALDI-TOF MS vizsgálatok alapján kiderült, hogy a libamájból és a sertéstarjából izolált törzsek methicillin-rezisztenciát mutatnak, ezért feltételezhető volt, hogy a törzsekben kimutatható a PBP2a szintéziséért felelős *mecA* gén. A vizsgálat során pozitív kontroll törzsként az ATCC 43300 MRSA törzset, míg negatív kontrollként az ATCC 29213 MSSA törzset alkalmaztam. Az élelmiszerekből izolált törzsek közül a libamájból és a sertéstarjából izolált törzsek esetében kimutattam a *mecA* génkomplexet.

3.8. Az élelmiszerekből izolált *S. aureus* törzsek enterotoxin termelésének vizsgálata

A multiplex PCR módszerrel elvégzett vizsgálat során a 47 élelmiszerből izolált *S. aureus* törzs közül 23 törzs esetében detektáltam SE géneket. Ezeknek a törzseknek a 91%-a csak egy SE gént hordozott, azonban 2 törzs esetében 2 gént is sikerült kimutatni. Az enterotoxint termelő 23 törzs 44%-ában *seh* gén, 31%-ában a *selp* gén volt kimutatható (2. ábra). A *seh* géneket a száraztésztákból és a húsokból izolált törzsek közül detektáltam, a *selp* gének pedig kimutathatók voltak a tejtermékekből, húsokból és a zöldségekből izolált *S. aureus* törzsek némelyikében. Az enterotoxint termelő törzsek 17%-a *sei* géneket hordozott, melyeket legfőképp baromfi húsokból izoláltam.



2. ábra Az SE gének megoszlása az enterotoxint termelő *S. aureus* törzsekben (n=23)

3.9. Az élelmiszerekből és haszonállatokból izolált *S. aureus* törzsek szekvencia-alapú tipizálásának eredményei

Az élelmiszerekből izolált törzsek nagy variabilitást mutattak, mivel a tipizálás során a 47 izolátumban 20 különböző *spa* típust határoztam meg. A leggyakrabban előforduló *spa* típus a t084-es volt, a törzsek 19%-a ebbe a típusba tartozott. Továbbá, két gyakori *spa* típus volt, a t091 és a t1491, mind a két típus esetében 13% volt az előfordulási gyakoriság. Két sertéshúsból származó izolátum esetében, eddig még nem ismert ismétlődés kombinációt azonosítottam a szekvenciákban. A libamájból izolált MRSA törzs a t706 *spa* típusba, a sertéstárjából izolált MRSA törzs pedig a t011 *spa* típusba tartozott.

A 20 azonosított *spa* típus közül, 8 *spa* típus esetében tudtam az adott mintához hozzárendelni a szekvencia típust. A leggyakrabban előforduló t084 *spa* típusú törzsek az ST15 MLST típusba tartoztak. A t091 *spa* típusú törzsek az ST7, a t213 *spa* típusú törzsek az ST12, a t127 *spa* típusú törzsek az ST1, a t002 *spa* típusú törzs az ST5 és a t011 *spa* típusú törzsek pedig az ST398 típusba tartoztak.

A haszonállatokból izolált 13 törzs közül, a t011, t034 és t127 *spa* típusba 4-4 törzs, míg a t458 *spa* típusba 1 törzs tartozott. A MLST vizsgálat alapján a t011 és a t034 *spa* típusú törzsek az ST398 MLST típusba tartoztak. A t127 *spa* típusú törzsekhez az ST1, míg a t458 *spa* típusúhoz az ST97 szekvencia típus lett hozzárendelve.

3.9.1. Az azonosított szekvencia típusok és a MALDI-TOF MS technikával kapott markerszettek összefüggéseinek elemzése

Az élelmiszerekből és haszonállatokból izolált törzsek (n=60) tömegspektrumaiban a 7 különböző ST típusra 4 specifikus csúcsot teszteltem és 14 specifikus csúcsot határoztam meg. Egy ST típusba több izolátum tartozott, ezért a megjelenő specifikus csúcsok előfordulási gyakoriságát tüntettem fel (13. táblázat).

13. táblázat: Az élelmiszerekből és haszonállatokból izolált törzsek spektrumaiban megjelent

ST specifikus csúcsok

Specifikus csúcs m/z	Előfordulási gyakoriság a szekvencia típusokban (%)							
	ST7 n=6	ST15 n=9	ST1 n=14	ST5 n=1	ST12 n=3	ST97 n=1	ST398 n=8	Ismeretlen n=18
3007 ^a	0	0	100	0	0	0	0	0
3891 ^b	0	0	0	100	0	0	0	0
5004 ^b	0	0	0	0	0	0	13	0
4511 ^c	0	0	0	0	0	0	100	0
3037	0	0	79	0	0	0	0	0
4860	100	100	0	0	0	0	0	0
4874	100	100	0	0	0	0	0	0
5598	0	0	36	0	0	0	0	0
5653	0	0	36	0	0	0	0	0
5800	0	0	0	0	100	0	0	0
6180	0	0	0	0	0	100	0	0
6453	0	0	21	0	0	0	0	0
6498	0	0	21	0	0	0	0	0
6536	0	0	21	0	0	0	0	0
6569	0	0	50	0	0	0	0	0
6575	100	0	0	100	100	0	100	78
6630	0	0	21	0	0	0	0	0
7143	0	0	0	0	0	100	0	0

^a JOSTEN és mtsai. (2014); ^b JOSTEN és mtsai. (2013); ØSTERGAARD és MOLLER (2018); ^c CAMOEZ és mtsai. (2015)

Az előző tanulmányokban meghatározott 3 specifikus csúcs (3007 m/z, 5004 m/z, 4511 m/z) az ST1 és ST398 típusú törzsek elkülönítését szolgálják. A 3007 m/z csúcs csak az ST1 típusú törzsekben, az 5004 m/z és 4511 m/z csúcs csak az ST398 típusú törzsekben jelent meg, az előző tanulmányok eredményeinek megfelelően.

A vizsgálatban meghatározott 14 csúcs közül a 4860 m/z, 6575 m/z és a 4874 m/z csúcs több különböző ST típusban is detektálható volt, azonban más specifikus csúcsokkal kombinálva egyedi markerszetteket hoztak létre.

4. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEI

1. Új minta-előkészítési módszert dolgoztam ki a módosított hangyasavas szuszpendálást (M-FA), mely alkalmazásával szignifikáns mértékben ($p < 0,05$) magasabb log score értékekkel azonosítottam az izolátumokat, mint direkt mintafelvitellel (DT) és hangyasavas direkt mintafelvitellel (DT-FA). Az M-FA és az EtOH extrakció minta-előkészítési eljárás során az azonosítási log score értékek között nem volt szignifikáns különbség, azonban az M-FA egy gyorsabb és költséghatékonyabb eljárás, mint az EtOH extrakció, ezáltal könnyebben beilleszthető a rutin laboratóriumi diagnosztikában.
2. A „*S. aureus* komplex” fajainak elkülönítésére 8 specifikus ion fragment értéket (2641 m/z, 3453 m/z, 5032 m/z, 5286 m/z, 4911 m/z, 4942 m/z, 6818 m/z, 6908 m/z) határoztam meg a referencia törzsek tömegspektrumainak elemzése során.
3. Az MRSA és a MSSA elkülönítésére 3 methicillin-rezisztencia specifikus csúcsot (2453 m/z, 2718 m/z, 3885 m/z) határoztam meg, melyek lehetővé tették az MRSA törzsek gyors azonosítását az élelmiszerekből származó *S. aureus* izolátumok közül.
4. Az élelmiszerekből izolált 47 *S. aureus* törzs vizsgálata során 2 izolátum esetében methicillin-rezisztenciát határoztam meg, melyek közül a sertéstarjából izolált MRSA törzs t011 *spa* típusú és a 398 szekvencia típusba tartozik, mely Európában a leggyakrabban előforduló állattenyésztéssel összefüggő MRSA típus.
5. A szekvencia típusok alapján 7 specifikus markerszettet határoztam meg MALDI-TOF MS módszerrel, melyek az ST7, ST15, ST1, ST5, ST12, ST97 és az ST398 típusú törzsek azonosítását és egymástól való elkülönítését segítik elő.

5. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA

1. A koaguláz-pozitív *Staphylococcus* fajok elkülönítése és azonosítása a fajok eltérő mértékű patogenitása és gazdaspecifitása miatt elengedhetetlen, mind az élelmiszer-mikrobiológiában, mind a humán-, és állatgyógyászatban egyaránt. Az élelmiszerek mikrobiológiai kritériumairól szóló, 2005. november 15-i 2073/2005/EK bizottsági rendelet az MSZ EN ISO 6888-1:2008-as szabványt írja elő a koaguláz-pozitív *Staphylococcus* fajok számának meghatározására, azonban ez nem teszi lehetővé a fajok azonosítását és nem tér ki az antibiotikum rezisztencia feltérképezésére sem. A MALDI-TOF MS technika egy megbízható, gyors és költséghatékony diagnosztikai módszer, melyet ma már széleskörben alkalmaznak mikroorganizmusok azonosítására.
2. Az újonnan kidolgozott módosított (M-FA) minta-előkészítési eljárás lehetővé teszi a *S. aureus* fajok magas log score értékkel történő azonosítását és a biomarkerek részletes elemzését. Továbbá a *S. argenteus* és *S. schweitzeri* specifikus csúcsok lehetővé teszik a „SAC” fajainak elkülönítését, melyre a klasszikus mikrobiológiai módszerek nem alkalmasak. Az M-FA eljárás egy egyszerű, időtakarékos valamint alacsony vegyszer és eszközigényű eljárás, mely ezáltal könnyen beilleszthető a rutin mikrobiológiai diagnosztikába.
3. A tesztelt illetve meghatározott specifikus csúcsoknak köszönhetően, egy méréssel számos információhoz juthatunk a *S. aureus* törzsek tömegspektrumainak elemzése során. A methicillin-rezisztencia specifikus csúcsok elősegítik az MRSA gyors azonosítását, mely a sikeres terápia elengedhetetlen részét képezi. Továbbá, az ST specifikus biomarkerek alkalmazása elősegítheti az egyes ST típusok elkülönítését és azonosítását, ezáltal lehetővé téve a törzsek epidemiológiai és evolúciós nyomonkövetését, melynek nagy jelentősége van mind élelmiszerbiztonsági, mind népegészségügyi szempontból.

6. IRODALOMJEGYZÉK

1. BRUKER DALTONIK GMBH (2013a): SOP - Ethanol Extraction (EX) Method, Rev.3 (August, 2013).
2. BRUKER DALTONIK GMBH (2013b): SOP - Direct Transfer (DT) Method, Rev.3 (August, 2013).
3. CAMOEZ, M. – SIERRA, M. J. - DOMINGUEZ, M. A. – FERRER-NAVARRO, M. – VILA, J. – ROCA, I. (2015): Automated categorization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates into different clonal complexes by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*. 22 (2), 161-168.
4. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI (2019): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eighteenth Informational Supplement M100- S18. Wayne, PA, USA: CLSI.
5. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA (2009): Assessment of the Public Health significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods.
6. JOSTEN, M. – DISCHINGER, J. – SZEKAT, C. – REIF, M. - AL-SABTI, N. – SAHL, H. G. – PARCINA, M. - BEKEREDJIAN-DING, I. – BIERBAUM, G. (2014): Identification of Agr-Positive Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Harboursing the Class A Mec Complex by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *International Journal of Medical Microbiology*. 304 (8), 1018-1023.
7. JOSTEN, M. - REIF, M. - SZEKAT C. - AL-SABTI, N. - ROEMER, T. - SPARBIER, K. - KOSTRZEWA, M. - ROHDE, H. - SAHL, H. G. - BIERBAUM, G. (2013): Analysis of the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrum of *Staphylococcus aureus* Identifies Mutations That Allow Differentiation of the Main Clonal Lineages. *Journal of Clinical Microbiology*. 51 (6), 1809 –1817.
8. MAGYAR SZABVÁNYÜGYI TESTÜLET - MSZ EN ISO 6888-1:2008: Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. Horizontális módszer a koagulázpozitív sztafilokokkuszok (*Staphylococcus aureus* és más fajok) számának meghatározására.
9. NATIONAL FOOD INSTITUTE – NFI (2012): protocol for pcr amplification of *meca*, *mecc* (*mecalga251*), *spa* and *pvl* recommended by the eurl-ar 2st version.
10. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD és EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL –

- ECDC (2019): Antimicrobial Resistance. Tackling the burden in the European Union. Briefing note for EU/EEA countries.
11. ØSTERGAARD, C. - MØLLER, J. K. (2018): Subdivision of MRSA CC398 isolates using MALDI-TOF MS. *International Journal of Medical Microbiology*. 308 (4), 476-485.
 12. PÉREZ-SANCHO, M. - VELA, A. I. - HORCAJO, P. - UGARTE-RUIZ, M. - DOMÍNGUEZ, L. - FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J. F. - DE LA FUENTE, R. (2018): Rapid differentiation of *Staphylococcus aureus* subspecies based on MALDI-TOF MS profiles. *Journal of Veterinary Diagnostic investigation*. 30 (6), 813–820.
 13. SCHUSTER, D. – RICKMEYER, A. J. – GAJDISS, M. – THYE, T. - LORENZENB, S. – REIF, M. - JOSTENA, M. – SZEKAT, C. - MELOA, L. D. R. - SCHMITHAUSENA, R. M. – LIÉGEOIS, F. – SAHL, H. G. – GONZALEZ, J. P. J. –NAGEL, M. - BIERBAUMA, G. (2017): Differentiation of *Staphylococcus argenteus* (formerly: *Staphylococcus aureus* clonal complex 75) by mass spectrometry from *S. aureus* using the first strain isolated from a wild African great ape. *International Journal of Medical Microbiology*. 307 (1), 57-63.
 14. THOMAS, J. C. - VARGAS, M. R. - MIRAGAIA, M. - PEACOCK, S. J. - ARCHER, G. L. - ENRIGHT, M. (2007): Improved Multilocus Sequence Typing Scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 45 (2), 616-619.
 15. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2017): WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals.
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258970/9789241550130-eng.pdf;jsessionid=51BB2C6AA4074B33FD789F6895A9B73F?sequence=1> letöltés dátuma: 2020.07.20.

7. MEGJELENT SAJÁT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/110/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Horváth Brigitta
Doktori Iskola: Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10056778

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Magyar nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (2)

1. **Horváth, B.**, Peles, F., Gasparik, J., Pocklán, E., Sipos, R., Erős, Á., Szabóné Petróczi, F. M., Szűcs, K. D., Albert, E., Micsinai, A.: Élelmiszerekből izolált Staphylococcus fajok antibiotikum rezisztencia vizsgálata.
Élelmiszervizsgálati Közlemények. Megjelenés alatt (-), 1-19, 2021. ISSN: 0422-9576.
2. **Horváth, B.**, Peles, F., Albert, E., Erős, Á., Sipos, R., Szűcs, K. D., Micsinai, A.: Állati eredetű, meticillin-rezisztens Staphylococcus aureus törzsek vizsgálata MALDI-TOF MS-módszerrel.
Magyar Állatorv. L. 142 (9), 545-551, 2020. ISSN: 0025-004X.
IF: 0.107 (2019)

Idegen nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (2)

3. **Horváth, B.**, Peles, F., Szél, A., Sipos, R., Erős, Á., Albert, E., Micsinai, A.: Molecular typing of foodborne coagulase-positive Staphylococcus isolates identified by MALDI-TOF MS.
Acta Aliment. 49 (3), 307-313, 2020. ISSN: 0139-3006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/066.2020.49.3.9>
IF: 0.458 (2019)
4. **Horváth, B.**, Peles, F., Bereczki, L., Széll, A., Sipos, R., Erős, Á., Lovász, C., Micsinai, A.: Comparison of sample preparation methods for the identification of Staphylococcus Aureus by MALDI-TOF MS.
Agrártud. Közl. 2019 (1), 9-14, 2019. ISSN: 1587-1282.
DOI: <http://dx.doi.org/10.34101/actaagrar/1/2362>

Idegen nyelvű konferencia közlemények (1)

5. **Horváth, B.**, Peles, F., Bereczki, L., Széll, A., Sipos, R., Erős, Á., Lovász, C., Micsinai, A.: Application of MALDI-TOF MS for identification of food associated Staphylococcus aureus.
In: Scientific researches in food production - 3rd meeting of young researchers from V4 countries : Conference Proceedings. Ed.: Béla Kovács, Nikolett Czipa, Ferenc Peles, Éva Bacsikainé Bódi, Andrea Kántor, Flóra Mária Szabóné Petróczi, Loránd Alexa, University of Debrecen, Debrecen, 17-22, 2018. ISBN: 9789634900320





Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (1)

6. **Horváth, B.**, Peles, F., Bereczki, L., Erős, Á., Sipos, R., Lovász, C., Micsinai, A.: Methicillin-rezisztens staphylococcus aureus (mrsa) MALDI-TOF MS módszerrel történő vizsgálata során alkalmazott mintaelőkészítési eljárások összehasonlítása.
In: Tavaszi szél konferencia 2018 Nemzetközi multidiszciplináris konferencia : Absztraktkötet. Szerk.: Keresztes Gábor, Doktoranduszok Országos Szövetsége, Budapest, 40, 2018. ISBN: 9786155586262

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (3)

7. **Horváth, B.**, Peles, F., Bereczki, L., Erős, Á., Sipos, R., Lovász, C., Micsinai, A.: Distinguishing Between MRSA (Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus) and MSSA (Methicillin-Sensitive Staphylococcus Aureus) with MALDI-TOF MS.
In: One Health and Food Safety Conference Proceedings. Ed.: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bonn, 97, 2018.
8. **Horváth, B.**, Peles, F., Bereczki, L., Erős, Á., Sipos, R., Lovász, C., Micsinai, A.: Identification of methicillin-resistant staphylococcus aureus (mrsa) by maldi-tof ms method.
In: Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája. Szerk.: Tamás László, Zelenyánszki Helga, JATEPress, Szeged, 94, 2018. ISBN: 9789633153703
9. **Horváth, B.**, Peles, F., Bereczki, L., Sipos, R., Erős, Á., Lovász, C., Micsinai, A.: Identification of food associated Staphylococcus aureus with MALDI-TOF MS.
In: Scientific researches in food production : Proceeding of abstracts, University of Debrecen, Debrecen, 19, 2018.

További közlemények

Magyar nyelvű könyvrészletek (1)

10. Biró, A., Homoki, J., Pesti-Asbóth, G., **Horváth, B.**, Cziáky, Z., Máthé, E., Gálné Remenyik, J.: Természetes eredetű antioxidánsok.
In: A fizioterápia dilemmái. Szerk.: Sandra Sándor, San-Ergonómia Kft., Budapest, 177-217, 2017. ISBN: 9786158081603

Idegen nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

11. Bojté, C., Lovász, C., Tímár, E., Lajkó, L., Nagy, J., Nagy, N. E., Bodnár, K. B., Czerődiné Kempf, L., **Horváth, B.**, Micsinai, A., Tóth, S. Z.: Development of seed analyses by means of various matrix solutions and the MALDI-TOF MS technique.
Agrártud. Közl. 2019 (1), 53-57, 2019. ISSN: 1587-1282.
DOI: <http://dx.doi.org/10.34101/actaagrar/1/2370>





Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (1)

12. Szabóné Petróczi, F. M., Pásztor, Á., Szűcs, K. D., Pál, K., Kardos, G., Albert, E., **Horváth, B.**,
Ungvári, E., Béri, B., Peles, F.: Occurrence and Characteristics of *Staphylococcus aureus* in
a Hungarian Dairy Farm during a Control Program.
Pathogens. 10 (2), 1-12, 2021. EISSN: 2076-0817.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens10020104>
IF: 3.018 (2019)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 3,583

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
0,565**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai
ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján
elvégezte.

Debrecen, 2021.03.24.

