

DEBRECENI EGYETEM
ÁLLATTENYÉSZTÉSI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető:

DR. KOMLÓSI ISTVÁN
egyetemi tanár
az MTA doktora

Témavezetők:

Dr. Peles Ferenc Árpád Ph.D. (adjunktus)
Dr. Micsinai Adrienn Ph.D. (WESSLING Hungary Kft. projekt menedzser)

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

Készítette:

HORVÁTH BRIGITTA
doktorjelölt

Debrecen

2021.

**A METHICILLIN-REZISZTENS *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* FERTŐZÖTTSÉG
VIZSGÁLATA HASZONÁLLATOKBAN ÉS ÉLELMISZEREKBE MALDI-TOF MS
TECHNIKA ALKALMAZÁSÁVAL**

**Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az állattenyésztési tudományok tudományágban**

Írta: Horváth Brigitta okleveles táplálkozástudományi szakember

Készült a Debreceni Egyetem Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola
(Állattermék-előállítás programja) keretében

Témavezetők: Dr. Peles Ferenc Árpád Ph.D.

Dr. Micsinai Adrienn Ph.D.

Az értekezés bírálói:

név	fokozat	aláírás
_____	_____	_____
_____	_____	_____

A bírálóbizottság:

	név	fokozat	aláírás
elnök:	_____	_____	_____
tagok:	_____	_____	_____
titkár:	_____	_____	_____

Az értekezés védésének időpontja: 20.... ..

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	7
1. BEVEZETÉS.....	9
1.1. Célkitűzések.....	10
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
2.1. A <i>Staphylococcus aureus</i> általános jellemzése	11
2.2. A <i>Staphylococcus aureus</i> virulenciafaktorai	12
2.2.1. A <i>Staphylococcus aureus</i> által termelt toxinok.....	13
2.2.2. Membrán-károsító toxinok (PFTs)	13
2.2.3. Epidermolítikus toxinok (ETs)	15
2.2.4. Szuperantigének (SAGs)	15
2.2.5. <i>Staphylococcus aureus mobilis</i> genetikai elemei	16
2.3. <i>Staphylococcus</i> okozta ételmérgezések – leggyakoribb enterotoxinok.....	17
2.4. A „<i>Staphylococcus aureus</i> komplex – SAC”	18
2.5. A <i>Staphylococcus</i> fajok antibiotikum rezisztencia mechanizmusai.....	20
2.6. Az MRSA népegészségügyi jelentősége.....	22
2.7. MRSA az állattenyésztésben és az állati eredetű élelmiszerekben	23
2.7.1. Az LA-MRSA epidemiológiája és prevalenciája	23
2.7.2. Az LA-MRSA kialakulásának lehetséges okai.....	25
2.7.3. MRSA az élelmiszerláncban	27
2.8. A <i>Staphylococcus</i> fajok meghatározásának módszerei.....	31
2.8.1. MALDI-TOF MS technika alkalmazása a mikroorganizmusok azonosításában	32
2.9. A <i>S. aureus</i> törzsek methicillin-rezisztenciájának meghatározása	35
2.9.1. Fenotípusos vizsgálati módszerek.....	35
2.9.2. Genotípusos vizsgálati módszer	37

2.9.3. MALDI-TOF MS technika alkalmazása az MRSA törzsek azonosításában	38
2.10. A S. aureus törzsek szekvencia alapú tipizálásának módszerei.....	39
3. SAJÁT VIZSGÁLATOK	42
3.1. Anyag és módszer.....	42
3.1.1. Vizsgálati helyszínek és időpontok	42
3.1.2. A mikrobiológiai vizsgálatok során alkalmazott táptalajok	42
3.1.3. A koaguláz-pozitív Staphylococcus fajok azonosítása	43
3.1.4. Vizsgált Staphylococcus aureus törzsek	43
3.1.5. MALDI-TOF MS vizsgálat	46
3.1.5.1. Eszközök, vegyszerek, oldatok.....	46
3.1.5.2. Alkalmazott minta-előkészítési eljárások	48
3.1.5.3. Mintatartó lemez előkészítése.....	49
3.1.5.4. MALDI-TOF MS mérés	49
3.1.5.5. Spektrumok értékelése.....	50
3.1.5.5.1. S. aureus törzsek azonosítása.....	50
3.1.5.5.2. A spektrumok részletes elemzése, kalibrálása	51
3.1.5.5.3. A spektrumok elemzése Excel programban	53
3.1.5.5.4. Spektrumok elemzése SPSS 16.0 program segítségével.....	53
3.1.6. S. aureus törzsek methicillin-rezisztenciájának meghatározása.....	53
3.1.6.1. Korongdiffúziós módszer	53
3.1.6.2. MRSA CHROMagar táptalaj alkalmazása	54
3.1.6.3. A mecA génkomplex vizsgálata.....	54
3.1.7. Szekvencia alapú tipizálási módszerek	59
3.1.7.1. spa tipizálás.....	59
3.1.7.2. MLST vizsgálat.....	62
3.1.8. Enterotoxinokat kódoló gének vizsgálata	64

3.2. Eredmények.....	67
3.2.1. Módszer optimalizálása a MALDI-TOF MS vizsgálatokhoz	67
3.2.1.1. Minta-előkészítési módszerek kidolgozása	67
3.2.1.2. Mátrix oldatok összehasonlítása	71
3.2.1.3. Táptalajok és a tenyésztési idő összehasonlítása	73
3.2.2. A spektrumok kalibrálásához szükséges csúcsok meghatározása	75
3.2.3. Izolátumok azonosítása MALDI Biotyper szoftverrel	77
3.2.4. A „S. aureus komplex” fajainak elkülönítése MALDI-TOF MS technikával ..	81
3.2.4.1. A specifikus csúcsok tesztelése az élelmiszerekből és haszonállatokból izolált törzseken	84
3.2.5. Methicillin-rezisztencia meghatározása MALDI-TOF MS technikával.....	86
3.2.6. Az élelmiszerekből izolált S. aureus törzsek methicillin-rezisztenciájának feltérképezése.....	88
3.2.6.1. MRSA specifikus csúcsok vizsgálata az élelmiszerekből izolált törzsek tömegspektrumaiban.....	88
3.2.6.2. Korongdiffúziós módszer eredményei	90
3.2.6.3. MRSA CHROMagar szelektív, differenciáló táptalaj vizsgálati eredményei ...	92
3.2.6.4. A <i>mecA</i> gén tipizálás eredményei	92
3.2.7. Az élelmiszerekből izolált S. aureus törzsek enterotoxin termelésének vizsgálata	93
3.2.8. Az élelmiszerekből és haszonállatokból izolált S. aureus törzsek szekvencia-alapú tipizálásának eredményei	95
3.2.9. Az azonosított szekvencia típusok és a MALDI-TOF MS technikával kapott markerszettek összefüggéseinek elemzése	98
4. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK.....	101
5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	104
6. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA.....	105
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	106

8. SUMMARY	108
9. IRODALOMJEGYZÉK	110
10. MEGJELENT SAJÁT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK	136
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	140
12. MELLÉKLETEK	141

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACN: acetonitrile (acetonitril)

CA-MRSA: community-acquired (közösségekben szerzett) methicillin-rezisztens

Staphylococcus aureus

CC: clonal complex (klonális komplex)

CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute (Klinikai és Laboratóriumi

Szabványügyi Intézet)

CP: capsular polysaccharide (kapszuláris poliszacharid)

DHB: 2,5-Dihydroxybenzoic acid

DT: direct transfer preparation (direkt mintafelvétel)

DT-FA: direct transfer preparation with formic acid (direkt mintafelvétel hangyasavval)

EtOH: ethanol extraction sample preparation (etanolos extrakciós módszer)

ETs: exfoliative toxins (epidermolitikus toxinok)

EU: Európai Unió

EGT: Európai Gazdasági Térség

FA: formic acid (hangyasav)

GI: gasztrointesztinális

HA-MRSA: healthcare associated (egészségügyi ellátással összefüggő) methicillin-

rezisztens *Staphylococcus aureus*

HL: hemolizin

Hlg: gamma (γ) –hemolizin

iPA: 2-propanol

IL: interleukin

LA-MRSA: livestock-associated (haszonállatokkal összefüggő) methicillin-rezisztens

Staphylococcus aureus

Luk: leukotoxin

MALDI-TOF MS: Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometer (Mátrix-asszisztált lézer deszorpció, ionizáció, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria)

MeOH: metanol

M-FA: modified formic acid suspension (módosított hangyasavas szuszpendálás)

MGEs: mobile genetic elements (mobilis genetikai elemek)

MLST: Multilocus sequence typing (multilókusz szekvencia tipizálás)

MRK: multirezisztens kórokozók

MRSA: methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*

MSSA: methicillin-szenzitív *Staphylococcus aureus*

PCR: polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)

PFTs: pore-forming toxins (membrán-károsító toxinok)

PFGE: pulsed-field gel electrophoresis (pulzáltatott mezejű gélelektroforézis)

PMF: peptide mass fringerprint (peptid-tömeg ujjlenyomat)

PSM: phenol-soluble modulín (fenolban oldódó modulín)

PVL: Panton-Valentine leukocidin

SA: sinapinic acid (szinapinsav)

SAC: *Staphylococcus aureus* komplex

SAGs: superantigens (szuperantigének)

SE: *Staphylococcus enterotoxin*

SFP: staphylococcal food poisoning (*Staphylococcus* okozta ételmérgezés)

spa: *Staphylococcus* protein A gén

SSL: staphylococcal superantigen-like (*Staphylococcus* szuperantigén-szerű toxin)

SSSS: *Staphylococcus* Scaled Skin Syndrome (*Staphylococcus* okozta forrázott bőr szindróma)

ST: sequence type (szekvencia típus)

TFA: trifluoroacetic acid (trifluorecetsav)

TNF: tumor nekrózis faktor

TSS: toxikus sokk szindróma

TSST-1: toxikus sokk szindróma toxin-1

α -HCCA: α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -ciano-4-hidroxi-fahéjsav)

1. BEVEZETÉS

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, 2009a; 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

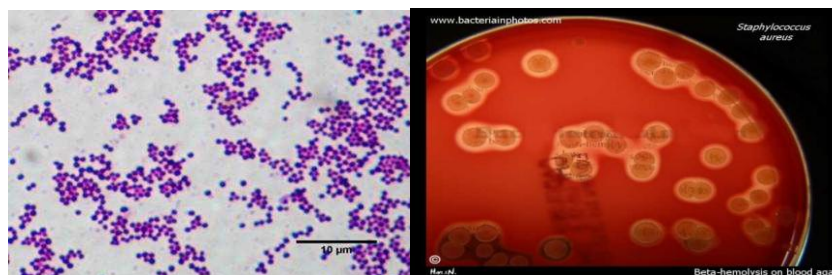
A WESSLING Hungary Kft. Élelmiszervizsgáló Mikrobiológiai laboratóriumába évente közel 5000 élelmiszer minta érkezik a koaguláz-pozitív *Staphylococcus* fajok számának meghatározására. Azonban, az erre a célra rendeletben előírt, MSZ EN ISO 6888-1:2008 szabvány nem teszi lehetővé a fajok, alfajok azonosítását, 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 fertőzöttségének 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. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A *Staphylococcus aureus* általános jellemzése

A *Staphylococcus*ok Gram-pozitív, 1 µm átmérőjű gömb alakú baktériumok, melyek általában szőlőfürtszerű (staphyli = szőlőfürt) halmazokba rendeződve láthatók a mikroszkópos képen (1. kép)(NAGY, 2017). A *Staphylococcaceae* családba tartoznak, a *Staphylococcus* genusban 58 fajt és 30 alfajt tartanak számon jelenleg (DSMZ, 2020). Csillókkal, spórákkal nem rendelkeznek, burkot nem képeznek és általában kataláz-pozitív baktériumok. Aerob és fakultatív anaerobok, melyek 37 °C-on inkubálva 1–3 mm átmérőjű fénylő, kerek, enyhén domború telepeket képeznek. A patogén törzsek véres agaron erős hemolízist mutatnak, a nátrium-telluritot tartalmazó táptalajokon pedig a telluritredukció hatására fekete színű telepeket képeznek. Népegészségügyi szempontból a *Staphylococcus* genus legjelentősebb tagja a *Staphylococcus aureus*, mely koaguláz-pozitivitásának köszönhetően könnyen megkülönböztethetővé teszi a többi koaguláz-negatív *Staphylococcus* fajtól. A normál flóra tagjai, ezért az emberek és az állatok bőrén, légutakban, a genitális régió nyálkahártyán és az emésztőcsatornában is megtalálhatóak (MEDVECZKY és mtsai, 1999).



1. kép *Staphylococcus aureus* mikroszkópos képe (bal oldal) és véres agar tenyésztete (jobb oldal) (forrás: NAGY, 2017)

Opportunista patogén baktérium, ezáltal klinikai tünetek megjelenése nélkül is kimutatható az egészséges emberek 9,1–57,8%-ban. A fertőzés típusától függően megkülönböztetünk lokalizált (seb, lágyrész, bőrfertőzések, tüdőgyulladás) és generalizált infekciókat (vérmérgezés, szepszis), valamint toxinok által kiváltott mérgezéseket (gastrointesztinális tünetek, toxikus sokk szindróma). A rezervoár széleskörű, lehet a tünetmentes és a klinikai tüneteket mutató kolonizált személy,

valamint a kontaminált tárgyak és élelmiszerek. A terjedés leggyakrabban közvetlen érintkezés útján megy végbe (SZABÓ, 2015), azonban az élelmiszer toxikoinfekciókat okozó leggyakoribb patogének közé is sorolható (DÉSI, 2013).

2.2. A *Staphylococcus aureus* virulenciafaktorai

A *S. aureus* jelentős számú virulenciafaktora és ezek különböző kombinációi teszik lehetővé a változatos lefolyású és típusú kórképeket. Három nagy csoportba sorolhatjuk a *S. aureus* virulenciafaktorait: a sejtfelszíni faktorok, extracelluláris enzimek, valamint a termelt toxinok és szuperantigének. Az adhéziót a sejt felszínéhez kötött elemek teszik lehetővé, valamint szerepet játszanak a fagocitózis gátlásában is. Továbbá a baktérium sejtfelszínén a gazdaszervezet megköti saját molekuláit, ezáltal elrejtve a mikrobát az immunrendszer elől. A számos adhezinnel köszönhetően különböző biológiai felszínekhez képes tapadni a mikroba (PÁL, 2013).

A *S. aureus* sejtfa peptidoglikán láncokból áll, melyek endotoxinszerű aktivitással bírnak, ezáltal lázkelteket, aktiválják a komplement rendszert, a kemotaktikus faktorok termelésével indukálják az interleukin-1 (IL-1) szekréciót, amely serkenti a monocitákat. Emellett hozzájárulnak a vérlemezkék aggregációjához és oldásához valamint a tályogképzéshez a fehérvérsejtek migrációjának gátlásával (PÁL, 2013). A sejtfaiban található teikolsav és lipoteikolsav is szerepet játszik a szövetek adhéziójában, ezáltal a fertőzés kialakulásában (SUZUKI és mtsai, 2011). A teikolsav és a lipoteikolsav a szöveti fibronectinekhez kapcsolódnak, azonban ezeken kívül más felszíni adhezinek, mint a fibrinogénkötő, kollagénekötő, és fibronectin-kötő fehérje is lehetővé teszik a tapadást (PÁL, 2013).

A *S. aureus* fajra jellemző sejtfelszíni fehérjék közül, a protein A és a clumping faktor a törzsek többségében megtalálható. A protein A Fc-doménhez történő kötődése blokkolja az antitestek azon képességét, hogy a mikroba felületére specifikus kötődési aktivitással elősegítsék az Fc-receptor által közvetített opsonophagocytosis-t ezáltal a baktérium elpusztítását (BECKER és mtsai, 2014). A clumping faktor lehetővé teszi a szövetekhez és a vérlemezékhez való kötődést. A vérplazmában megköti a fibrinogént, ami fibrinné alakul, amely a sejtek agglutinációját okozza. A *S. aureus* törzsek poliszacharid tokot képesek képezni, amelyek a baktérium felületét és azon lévő fehérjéket elrejtik az immunrendszer fagocitáitól. A sejtfaon lévő toknak két szerotípusa ismert, az 5 poliszacharidból (CP5) és a 8 poliszacharidból (CP8) álló típus.

A klinikai izolátumok 75%-a rendelkezik tokkal, a CP8 típusú törzsek a leggyakoribbak (KUIPERS és mtsai, 2016). A poliszacharid tok a biofilm képzés egyik jelentős faktora, melynek mennyisége összefüggésben áll a tok típusával. A CP5 típusú törzsek több biofilmet és vékonyabb poliszacharid tokot képeznek, mint a CP8 típusúak (SALIMENA és mtsai, 2016).

A *S. aureus* számos extracelluláris enzimet termel, amelyek közül többet fontos virulenciafaktornak tekintenek. Ezek közül néhány enzim megtámadja azokat a molekulákat, amelyek részt vesznek a gazdaszervezet fertőzés elleni védekezésében. 22 extracelluláris enzimet kódoló gént azonosítottak. A klinikai mikrobiológiában a koaguláz termelés a fő kritérium a *S. aureus* azonosítása során, azonban a patogenitásban nem tisztázott a szerepe. A koaguláz enzim a humán protrombin enzimmal egy ún. staphylostrombin komplexet hoz létre, mely a fibrinogént fibrinné képes átalakítani. Emellett a koaguláz a szolúbilis fibrinogénhez is képes kötődni, szemben a clumping faktorral, amely egy különálló fibrinogénköti fehérje és csak a szilárd fázisú fibrinogénekhez kötődik. A koaguláz mellett a törzsek nagy része termel proteázokat (szerin proteáz, cisztein proteáz, metalloproteáz), lipázokat (glicerín-észter hidroláz, foszfolipáz C), zsírsav módosító enzimet, hialuronát liázt és nukleázt (ARVIDSON, 2006).

2.2.1. A *Staphylococcus aureus* által termelt toxinok

A *S. aureus* fajok által termelt toxinokat az különbözteti meg a többi virulencia faktortól, hogy ezek közvetlenül károsítják a gazdaszervezetet. A toxinokat hatásmechanizmusok alapján, három kategóriába sorolhatjuk: membrán-károsító toxinok (pore-forming toxins - PFTs), epidermolitikus toxinok (exfoliative toxins - ETs) és szuperantigének (SAGs) (ARGUDÍN és mtsai, 2010).

2.2.2. Membrán-károsító toxinok (PFTs)

A hemolizin alfa toxin (Hla vagy α -toxin) egy 33 kDa tömegű fehérje, melyet a klinikai *S. aureus* izolátumok 95% szekretál (GRUMANN és mtsai, 2014). A Hla önmagában nem tekinthető toxikusnak, azonban a sejtek membránjához kötődve pórust formálnak, ezáltal megnövelve a sejtek membránjának permeabilitását, majd lízisét (SONG és mtsai, 1996). A sejtek szétesésén túl azonban alternatív szignál útvonalakat

is indukál, melynek következménye a sejtprolifерáció, a citokin szekréció és a gyulladásos reakció (PARKER és FEIL, 2005). A Hla toxin a humán szervezet sejtípusainak széles skáláját érinti, ideértve az endotél, epítél sejteket, T-sejteket, fagocitákat, makrofágokat (BERUBE és WARDENBURG 2013).

A hemolizin béta toxin (Hlb vagy β -toxin), más néven a szfingomielináz toxin egy foszfodiészter-hidroláz, mely hasítja a szfingomielineket, melyek a legelterjedtebb szfingolipidek az eukarióta membránban (FLORES-DÍAZ és mtsai, 2016). A toxin hemolitikus képességét a sejtek szfingomielin-tartalma határozza meg, ezért lehetséges az, hogy a juhok esetében erős, míg a nyulak esetében gyengébb a hemolitikus hatás. A patogenitásban betöltött szerepe nem tisztázott (DINGES és mtsai, 2000), azonban a Hlb citotoxikus hatást fejt ki a monocitákra, leukocitákra, T-limfocitákra és gátolja az IL-8 expresszióját az endotél sejtekben (KATAYAMA és mtsai, 2013). A Hlb toxin a szarvasmarhák tüdőgyulladására során izolált és a humán krónikus bőrfertőzésekben izolált törzsekre jellemző leginkább (AARESTRUP és mtsai, 1999; KATAYAMA és mtsai, 2013).

A leukotoxinok közül eddig 4 különböző toxint izoláltak, melyeket összefüggésbe tudtak hozni a humán fertőzésekkel: a Pantón-Valentine leukocidin (PVL), gamma (γ) - hemolizin (HlgA, HlgC, HlgB), leukotoxin ED (LukE, LukD) és leukotoxin AB/GH (LukAB / LukGH). Szerkezeti felépítésük hasonló az α -toxinéhoz (YOONG és TORRES, 2013). A PVL egy olyan erős citotoxin, mely a leukocitákon keresztül a súlyos szöveti nekrozis, bőrtályogok, bőrfertőzések kialakításában játszik szerepet (CRIBIER, 1994). A γ -hemolizin csoporton belül, a fehérjék különböző alegység-kombinációkban fordulnak elő. A HlgAB magas hemolitikus aktivitást és citolitikus hatást mutat a humán szervezetben. Ezzel szemben a HlgCB a vörösvértestekkel szembeni hemolitikus aktivitása alacsony (PRÉVOST és mtsai, 1995; SEILIE és WARDENBURG, 2017). A LukED citolitikus hatását nyulak vértestjein és leukocitáin bizonyították, valamint egér kísérletekben beszámoltak toxin mediált fagocita pusztulásról (SEILIE és WARDENBURG, 2017). Japánban a LukED géneket a klinikai izolátumok 87-93%-ában, világszerte pedig a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) törzsek 88-99%-ában detektálták, mely utalhat a toxin patogenitásában betöltött szerepére (VANDENESCH és mtsai, 2003; LIU és mtsai, 2015). A LukAB/GH a legújabb toxin, amelyet a leukotoxin csoporton belül felfedeztek (VENTURA és mtsai, 2010). A toxin elősegíti a neutrofil extracelluláris csapda

kialakítását, ami hozzájárul a gyulladásos válaszhoz, ezáltal a gazdaszervezet képes védekezni a fertőzéssel szemben (MALACHOWA és mtsai, 2013).

A fenolban oldódó modulinokat (PSM – phenol-soluble modulin) 1999-ben fedezték fel Mehlin és mtsai, egy *S. epidermidis* izolátumban, mely során három különböző peptidet azonosítottak: a PSM α -t, PSM β -t és a PSM γ -t (MEHLIN és mtsai, 1999). A PSM peptidek biofilm-képző tulajdonságuk mellett citolitikus hatással bírnak, valamint stimulálják a gyulladásos reakciókat (PERIASAMY és mtsai, 2012).

2.2.3. Epidermolitikus toxinok (ETs)

A *S. aureus* fajok által szekretált epidermolitikus toxinok rendkívül specifikus szerin proteázok, melyek hidrolizálják a dezmoszóma kadherin fehérjéit a bőrhámban, ezáltal hámlást és hólyagképződést kiváltva (BUKOWSKI és mtsai, 2010). A toxinnak 4 különböző antigén típusa ismert, az ETA, ETB, ETC és ETD (LEE és mtsai, 1987). Európában, Afrikában és Amerikában az ETA, míg Japánban az ETB a legelterjedtebb (LADHANI, 2001). Általában lokalizált bőrfertőzésekből vagy forrázott bőr szindrómában szenvedő újszülöttekből (*Staphylococcus* Scaled Skin Syndrome - SSSS) izolált törzsekben azonosították az ETA és ETB toxinokat (MARIUTTI és mtsai, 2017). Az ETC-t lovak fertőzése során azonosították, humán infekciókkal még nem sikerült összefüggésbe hozni (LEE és mtsai, 1987; MARIUTTI és mtsai, 2017).

2.2.4. Szuperantigének (SAGs)

A szuperantigéneket eredetileg *Staphylococcus* enterotoxinoknak (SE) nevezték, mivel a *S. aureus* okozta ételmérgezést követően gasztrointesztinális (GI) tünetek (hasmenés, hányás) jelentkeztek. Azonban azonosítottak olyan toxinokat is, melyek következményeképpen nem jelentkeztek a klasszikus GI tünetek, ezért 2004-ben a Nemzetközi Elnevezéstani Bizottság javaslatot tett a SE elnevezés megváltoztatására (GRUMANN és mtsai, 2014). Több mint 23 SAGs toxint azonosítottak, melyek közé tartoznak az enterotoxinok és a toxikus sokk szindrómát kiváltó toxin (TSST-1) is, emellett meghatároztak 11 szuperantigén-szerű (staphylococcal superantigen-like - SSL) toxint is, mint például a SEIQ, SEIK, SEIX és SEIU (ONO és mtsai, 2008; GRUMANN és mtsai, 2011). A szuperantigének nagyszámú T-sejtet aktiválnak, mivel egy kevésbé specifikus, V β elemét ismerik fel a T-sejtek receptorainak. Minden olyan

T-sejt aktiválódik, mely rendelkezik a megfelelő V β elemmel, ezáltal kiváltva a citokin-vihart, mely toxikus sokk szindrómában (láz, kiütés, hányás, hasmenés, hipotenzió, többszervi elégtelenség) mutatkozik meg (McCORMICK és mtsai, 2001).

Az enterotoxinok hőstabil fehérjék, melyek ellenállnak a gyomorsavnak, valamint rezisztensek a gasztrointesztinális proteázok (pepszin, tripszin, renin) aktivitására (LE LOIR és mtsai, 2003). A *Staphylococcus* okozta ételmérgezés (staphylococcal food poisoning- SFP) során, a toxinok a belek és a gyomor lumenében lévő receptorokhoz kötődnek, ezáltal csökken a víz visszaszívása és fokozódik a perisztaltika, amely hányást és hasmenést okoz. A véráramba jutva citokin, tumor nekrozis faktorok (TNF α , TNF β), interleukin-1 β és interleukin-2, valamint interferon- γ szabadul fel a sejtekből, amely toxikus sokk szindrómát indukál (CARLSSON és mtsai, 1988; TIEDEMANN és FASHER, 1996).

2.2.5. *Staphylococcus aureus mobilis* genetikai elemei

A mobilis genetikai elemeket (MGEs) először 1950-es évek elején írták le a kukorica genomjában (McCLINTOCK, 1950; McCLINTOCK, 1951). A MGEs olyan DNS fragmentek összessége, melyek a virulenciát és rezisztenciát meghatározó tényezőket kódolják, valamint azokat az enzimeket, melyek a DNS-ből történő átvitelt és a DNS-be történő integrációt segítik elő (FROST és mtsai, 2005). A MGEs fágvektorokból, plazmidokból, transzpozonokból, patogenitási szigetekből és kromoszóma kazettákból áll, melyek nagyrészt vertikális géntranszfer útján továbbítódnak (MALACHOWA és DELEO, 2010). A baktériumok a sejtekből vagy a környezetből három különféle úton szerezhetnek új genetikai információt: 1. szabad DNS felvétele a környezetből (transzformáció), 2. a baktériumsejtek közötti közvetlen kapcsolat útján (konjugáció), 3. bakteriofág transzdukció során (HACKER és KAPER, 2000).

A *S. aureus* törzsek heterogenitása részben a gazdaszervezettel történő kölcsönhatás következtében alakult ki, hiszen az MGEs-ben található virulenciafaktorok egy része közvetlenül felelős az adaptációért (BABA és mtsai, 2002; LINDSAY és HOLDEN, 2004). Az antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát és az anyagcserében résztvevő molekulákat kódoló gének mellett, a *Staphylococcus* plazmidok különféle szerves és szervetlen ionok, mint például a kadmium, higany és arzén rezisztenciát is kódolhatnak (JENSEN és LYON, 2009). A MGEs, a genom mindössze 25%-át teszik ki, azonban

nagymértékben hozzájárulnak a baktérium alkalmazkodásához és túléléséhez (LINDSAY és HOLDEN, 2004).

2.3. *Staphylococcus* okozta ételmérgezések – leggyakoribb enterotoxinok

Az Amerikai Egyesült Államokban 2000-2008 között 241000 *S. aureus* okozta ételmérgezést regisztráltak, ezáltal az ötödik leggyakoribb ételmérgezést okozó kórokozónak nyilvánították. Az Európai Unióban 2016-ban az élelmiszer-eredetű megbetegedések 8%-át, Ausztráliában 2000-2012 között az esetek 1%-át, míg Kínában 2013-ban az ételmérgezések 12,5%-át okozta *S. aureus* (PILLSBURY és mtsai, 2013; EFSA, 2017; WANG és mtsai, 2017). A baktérium toxinok által okozott élelmiszer-eredetű zoonótikus megbetegedések között első helyen állnak a *Staphylococcus* enterotoxinok (EFSA, 2020).

A kórokozó számos módon bekerülhet az élelmiszerláncba, azonban a kontamináció leggyakoribb útja a dolgozók és a berendezések nem megfelelő higiéniája, valamint a szennyezett alapanyag (HENNEKINNE és mtsai, 2012; FISHER és mtsai, 2018). Az EFSA 2016-ban közzétett összefoglalója alapján az Európai Unióban az SFP járványok 31%-a esetében kevert típusú élelmiszer (kettő vagy több alapanyag felhasználásával készült), 22%-a esetében pedig tej és tejtermék volt a fertőző forrás (EFSA, 2017). 2018-ban, a *S. aureus* bekerült a 10 leggyakoribb kórokozó közé, melyek szennyezett élelmiszer vagy víz útján a legtöbb kórházi ápolást eredményezik (EFSA, 2019). Az Amerikai Egyesült Államokban az SFP kitörések 55%-át sertéshúsból és baromfiból készült ételek, sonkák okozták (BENNETT és mtsai, 2013).

Az SFP járványok 80%-a esetében a *Staphylococcus* enterotoxin A (SEA) váltotta ki a megbetegedéseket, majd ezt követően a leggyakrabban a SEB (10%), SEC és SED toxinokat azonosították, függetlenül a vizsgált régiótól (ROZGONYI és mtsai, 2009; ARGUDÍN és mtsai, 2010; PINCHUK és mtsai, 2010; HENNEKINNE és mtsai, 2012). Az Egyesült Királyságban 1969 és 1990 között az SFP járványok 79%-át, míg Franciaországban 1981 és 2002 között az SFP kitörések 69,7%-át okozta SEA (WIENEKE és mtsai, 1993; KÉROUANTON és mtsai, 2007). Klinikai esetekben egyéb enterotoxinokat, mint például a SEH-t is azonosították már, azonban az SFP járványokban betöltött szerepük ellentmondásos (FISHER és mtsai, 2018).

2.4. A „*Staphylococcus aureus* komplex – SAC”

Korábbi tanulmányok alapján a *Staphylococcus* nemzetségen belül 7 koaguláz-pozitív fajt (*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi*, *S. hyicus*, *S. lutrae*, *S. delphini* és a *S. pseudintermedius*) tartottak számon (FRENEY és mtsai, 1999; DEVRIESE és mtsai, 2005). A közelmúltban azonban két új, koaguláz-pozitív *Staphylococcus* fajt írtak le, a *S. argenteus*-t és a *S. schweitzeri*-t, melyeket korábban a *S. aureus* klonális komplex eltérő vonalaiként azonosítottak (TONG és mtsai, 2015).

A *S. argenteus* törzset 2011-ben HOLT és mtsai egy ausztráliai őslakos véreből, míg a *S. schweitzeri* törzset 2012-ben SCHAUMBURG és mtsai, Afrikában egy vörösfarkú majomból (*Cercopithecus ascanius*) izoláltak. Tripton-szója agaron nagy, kerek, sima felszínű telepeket képeznek hasonlóan a *S. aureus* fajhoz, azonban a *S. schweitzeri* sárgás színű, míg a *S. argenteus* (nem-pigmentált) krémfehér telepeket képez. Mind a két faj kataláz - és koaguláz pozitív, valamint véres agaron β -hemolízist mutatnak, közel azonos 16S rRNS génszekvenciával rendelkeznek és hasonló a zsírsav és a menakinon összetételük. A három faj biokémiai tulajdonságai is közel azonosak (1. táblázat), azonban a *nucA* gént csak a *S. aureus* és *S. argenteus* fajokban tudták kimutatni PCR technikával (TONG és mtsai, 2015).

1. táblázat: A *S. aureus*, *S. argenteus* és *S. schweitzeri* fajok biokémiai jellemzői

Biokémiai teszt	<i>S. aureus</i>	<i>S. argenteus</i>	<i>S. schweitzeri</i>
d-xilóz bontás	-	-	-
arginin dihidroláz 1 termelés	+	+	+
β -galaktozidáz termelés	-	-	-
foszfatáz termelés	+	+	+
β -glükuronidáz termelés	-	-	-
pirrolidonil arilamidáz termelés	+	+	+
ureáz termelés	-	-	-
Polymixyn B rezisztencia	+	+	+
laktáz termelés	-	-	-
N-acetil-d-glükozamin bontás	+	-	-
maltóz termelés	+	+	+
Novobiocin rezisztencia	-	-	-
d-mannitol bontás	+	+	+
d-mannóz bontás	+	+	+
raffinóz bontás	-	-	-
szacharóz bontás	+	+	+
trehalóz bontás	+	+	+
d-ribóz bontás	-	+	-
d-galaktóz bontás	+	-	+

Forrás: TONG és mtsai, (2015)

Filogenetikai szempontból a két új faj a *S. aureus* legközelebbi rokonainak tekinthető, azonban a teljes genom szekvenálás eredményeinek elemzése 3 egyértelműen különálló csoportot mutatott, a genom hibridizációs hasonlóságuk kisebb volt, mint 70% (TONG és mtsai, 2015). ZHANG és mtsai, (2017) faj specifikus géneket határoztak meg, amely többek között magyarázatot adtak a *S. argenteus* eltérő pigment képzésére. A *S. argenteus* fajban nincs jelen a sztafiloxantin útvonalat kódoló *crtOPQMN* operon, amely a telepek sárgás színét okozza. A *S. aureus* fajban eddig meghatározott 111 virulencia gén több mint 70%-a van jelen a másik két fajban. A *S. argenteus* és *S. schweitzeri* fajban hiányzó gének (melyek megközelítőleg 17%-ot tesznek ki) nagy része enterotoxinokat kódol, azonban a *nuc_m*, *spa*, *pvl*, *sak*, *scn*, *seb*, *sec*, *selk*, *selq* és *tsst* mind a három fajban jelen volt. A hiányzó virulenciagének, melyek az enterotoxinokat és egyéb exotoxinokat kódolják, általában a mobilis genetikai elemekben találhatóak, melyek könnyen cserélődnek a SAC fajok között. Összességében elmondható, hogy a két új faj minden olyan virulenciagént hordoz, amely a *S. aureus* patogenitásában részt vesz (ZHANG és mtsai, 2017).

A *S. argenteus* fajt többnyire humán bőr- és légyszöveti fertőzésekből izolálták, ritkán okoz invazív betegségeket (TONG és mtsai, 2013; THAIPADUNGPANIT és mtsai, 2015; RIGAILL és mtsai, 2017). Kevésbé tartották virulensnek a *S. aureus* fajhoz viszonyítva a sztafiloxantin hiánya miatt, mivel a sárga pigment védelmet nyújt az oxidatív stresszel szemben (LIU és mtsai, 2005; HOLT és mtsai, 2011). *In vitro* kísérletekben valóban érzékenyebb volt az oxidatív stresszel szemben, mint az *S. aureus*, továbbá csökkent virulenciát mutatott rágcáslok bőrfertőzései és szepszisei során, azonban ez nem volt összefüggésben a sztafiloxantin expresszióval (TONG és mtsai, 2013; TONG és mtsai, 2015; CHANTRATITA és mtsai, 2016). A humán esetekben hasonló vagy magasabb halálozási arányról számoltak be, mint a *S. aureus* esetében (THAIPADUNGPANIT és mtsai, 2015;; CHANTRATITA és mtsai, 2016; CHEN és mtsai, 2018). A *S. argenteus* okozta ételmérgezésekről kevés tanulmány született, azonban Japánban több egymástól független SFP járványról is beszámoltak, melyeket *S. argenteus* faj okozott (WAKABAYASHI és mtsai, 2017; SUZUKI és mtsai, 2017; SHI és ZHANG 2018). Virulenciája és patogenitása alapján a *S. argenteus* faj népegészségügyi és élelmiszerbiztonsági kockázata is jelentős.

A *S. schweitzeri* számos azonos szuperantigénnel rendelkezik, mint a *S. aureus* és a *S. argenteus*, leginkább mégis csak afrikai főemlősökből és denevérekből izolálták. Ezidáig mindössze 3 izolátum származott emberi mintából, melyhez nem társult

fertőzés vagy klinikai tünet. Annak ellenére, hogy a *S. schweitzeri* fenotípusában (sárga pigmentképzés) nagyobb hasonlóságot mutat a *S. aureus* fajhoz, mint a *S. argenteus*, patogenitása különbözik a másik két fajtól (ATEBA és mtsai, 2012; OKUDA és mtsai, 2016). Alacsony megbetegítő képességét feltételezhetően a $\phi 3$ profág génjeinek (a *scn*, *chp* és a *sak*) hiánya okozza, melyek a humán adaptációban és az immunválasz elkerülésében játszanak szerepet (SCHAUMBURG és mtsai, 2012; OLATIMEHIN és mtsai, 2018). Eddigi ismereteink alapján, a *S. schweitzeri* nem jelent jelentős humán egészségügyi és élelmiszerbiztonsági kockázatot (ATEBA és mtsai, 2012; OKUDA és mtsai, 2016).

2.5. A *Staphylococcus* fajok antibiotikum rezisztencia mechanizmusai

A *S. aureus* fertőzésekben szenvedők mortalitása a preantibiotikus korban meghaladta a 80%-ot (SKINNER és KEEFER, 1941). Az 1940-es években bevezetett első antibiotikum, a penicillin, nagymértékben javított a fertőzések prognózisán, azonban már 1942-ben megjelentek az első rezisztens *S. aureus* törzsek (RAMMELKAMP és MAXON, 1942). A kialakult rezisztenciát egy penicillináz/ β -laktamáz enzim okozta, mely a β -laktám gyűrűt hidrolizálta ezáltal inaktíválva a hatóanyagot (KIRBY, 1944; BONDI és DIETZ, 1945). A β -laktamáz enzimet a *blaZ* gén kódolja, mely jellemzően egy nagy transzpozonon helyezkedik el. A humán szervezetből izolált *S. aureus* törzsek több mint 90%-a vált rezisztenssé a penicillinre. A penicillin rezisztencia kialakulása miatt, 1959-ben egy methicillin nevű, félszintetikus penicillináz-rezisztens β -laktámot kezdtek el alkalmazni a klinikumban, azonban 1960-ban már izoláltak methicillin-rezisztens *S. aureus* (MRSA) törzseket (JEVONS, 1961; BARBER, 1961). A későbbiekben a rezisztens törzsek az egész világon előfordultak, beleértve azokat az országokat is, ahol nem állt rendelkezésre methicillin (AYLIFFE, 1997; MOELLERING, 2012). Az Európai Unióban, az MRSA évente több mint 150000 beteget érint és 380 millió euró összegű többletköltséget okoz az egészségügyi ellátórendszernek (KÖCK és mtsai, 2010). A methicillint ma már nem alkalmazzák a klinikumban és a kereskedelmi forgalomból is kivonták, azonban az MRSA kifejezés jelenleg is használatos. A methicillin-rezisztencia kifejezés gyakorlatilag a β -laktámokkal szembeni rezisztenciát jelöli, a cefalosporin β -laktám legújabb generációját kivéve (RODVOLD és McCONEGHY, 2014; STRYJEWSKI és COREY, 2014). A fertőzések kezelésének lehetőségeit korlátozza továbbá a *S. aureus* törzsek vankomicin

és az újabb típusú szerek, mint a linezolid és a daptomycin rezisztenciája (KOS és mtsai, 2012; GOULD és mtsai, 2012).

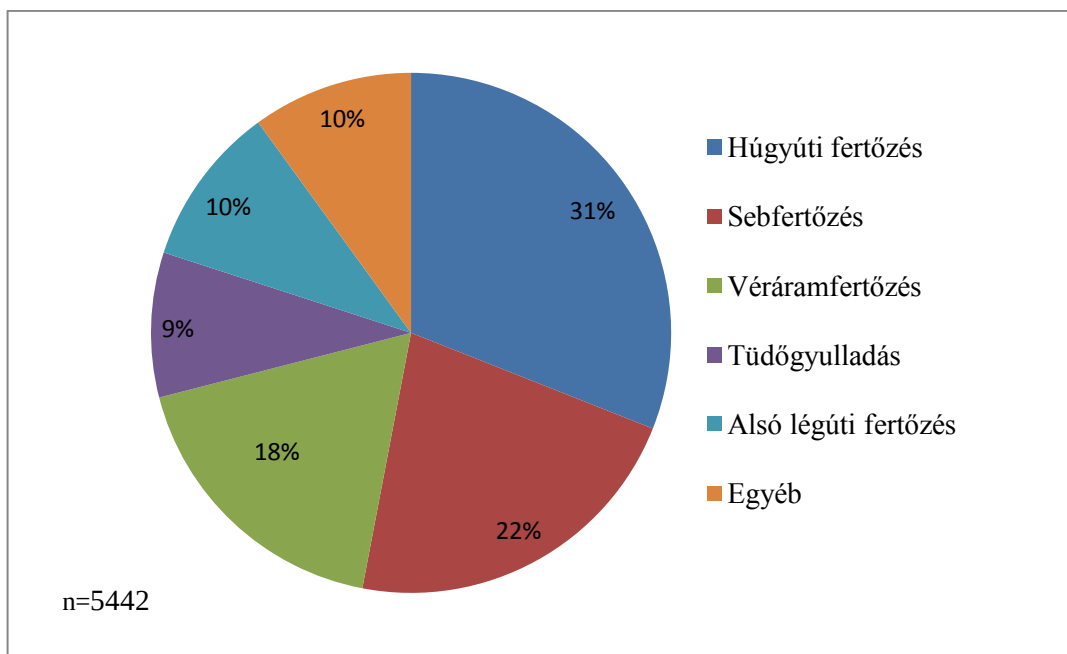
A β -laktámok a baktérium sejtfalának bioszintézisét gátolják. A sejtfa fő szerkezeti eleme a peptidoglikán, melyek N-acetil glükózaminokból és N-acetil muraminsavakból állnak, amelyek keresztkötéssel kapcsolódnak egymáshoz. Az N-acetil glükózamin és az N-acetil muraminsav közötti transzpeptidációt a penicillin-kötő fehérjék (penicillin-binding proteins – PBP) hajtják végre, mely a β -laktámok specifikus célpontja (LOVERING és mtsai, 2012). A transzpeptidázok elégtelen működése a methicillin-szenzitív baktériumok sejtfalának meggyengüléséhez, citolíziséhez vezet. Az MRSA törzsekben egy módosult PBP jelenlétét figyelték meg, a PBP2a-t, mely csökkent affinitással rendelkezik a β -laktámok iránt, így önmagában is lehetővé teszi a peptidoglikán sejtfa szintézisét, ezáltal elkerülve a baktérium pusztulását (BERGER-BÄCHI, 1994; BERGER-BÄCHI és ROHRER, 2002; FISHOVITZ és mtsai, 2014).

A PBP2a transzpeptidázt a *mecA* gén kódolja, mely a *Staphylococcus* kromoszómális kazettán (Staphylococcal cromosomal cassette – *SSCmec*) helyezkedik el (LIM és STRYNADKA, 2002). Az *SSCmec* egy olyan mobilis genetikai elem, mely a *mecA*-n kívül egyéb funkcionális géneket is hordoz. Az *SSCmec* alapvetően két komponensből tevődik össze, a *mec* és a *ccr* gén komplexből (STAPLETON és TAYLOR, 2007). A *mec* gén komplex a *mecA* és a szabályozó génekből áll, valamint a hozzájuk kapcsolódó inszerciós szekvenciákból. A *ccr* gén komplex rekombinázoikat kódol, melyek az *SSCmec* kivágódását és más *Staphylococcus* törzsekbe történő integrációját szabályozzák (ZONG és mtsai, 2011; DUARTE és LENCASTRE, 2011). A *mec* gén komplex A és B osztályát, a *ccr* gén komplex 3 különböző típusát (I., II., III. típus) írták le, melyek kombinációi alapján 10 különböző *SSCmec* típust/altípust azonosítottak – I (1B), II (2A), III (3A), IV (2B), IV (2B&5), V (5C2), V (5C2&5), VI (4B), VII (5C1), VIII (A4) (IWG-SCC, 2009).

Az *SSCmec* a MGEs-ben található, ezáltal horizontális génátviteli mechanizmusok révén elveszhetnek a genomból, valamint megszerezhetővé válnak más koaguláz-pozitív és koaguláz-negatív *Staphylococcus* törzsek számára, amely lehetővé teszi a rezisztencia terjedését (LINDSAY, 2014). Az MGE-k azonban nem csak a rezisztenciáért, hanem a virulenciáért és az adaptációért felelős géneket is kódolják, melyek relevánsak a baktérium túlélése és a környezethez való alkalmazkodása során (LINDSAY, 2010).

2.6. Az MRSA népegészségügyi jelentősége

A multirezisztens kórokozók (MRK) és az általuk kiváltott nozokómiális infekciók világszerte emelkedést mutatnak és egyre nagyobb kihívás elé állítják az egészségügyi ellátórendszert. Magyarországon az első MRSA járványt 1993-ban egy megyei kórházban regisztrálták, azóta azonban több száz esetet jelentettek (BÖRÖCZ, 2001, BÖRÖCZ, 2005). Hazánkban 2018-ban 131 nozokómiális járvány fordult elő, melynek 77,9%-a nem specifikus (közösségekben is előforduló), 22,1%-a specifikus, tehát kizárólag az egészségügyi ellátórendszer körülményei miatt alakult ki. A jelentett járványok száma emelkedést mutatott az előző évi adatokhoz viszonyítva. A specifikus járványok 55,2%-át (5442 eset) okozta MRK, amelynek 18,5%-a (1009 eset) MRSA fertőzés volt. A MRK okozta infekciók klinikai megjelenési formái hasonlóan alakultak az előző évi adatokhoz viszonyítva (1. ábra) (ANTSZ, 2018).



1. ábra A MRK okozta nozokómiális infekciók klinikai megjelenési formái 2018-ban (Forrás: ANTSZ, 2018)

Az előző évekhez hasonlóan, 2018-ban a sebfertőzések harmadik leggyakoribb kórokozója a *S. aureus*, melynek 64%-a methicillin-rezisztens törzs volt. A harmadik leggyakoribb megjelenési formája az MRK infekciónak a véráramfertőzés (18%) volt,

melyet elsősorban *Staphylococcus* fajok okoztak. Magyarországon 2018-ban a tesztelt összes izolátum 23,1%-a volt MRSA, mely az elmúlt évek adataihoz viszonyítva szignifikánsan nem változott (ANTSZ, 2018).

Az MRSA fertőzések incidenciája változatosan alakul a különböző országokban, azonban Európában még mindig az egyik leggyakoribb oka a súlyos bakteriális fertőzéseknek. Az Európai Unió (EU) és az Európai Gazdasági Térség (EGT) népességére vonatkoztatva, az MRSA arányának súlyozott átlaga 2018-ban 16,4%-ot tett ki. Az országok egyharmada szignifikáns csökkenésről számolt be a 2015. és 2018. év adatait tekintve. Romániában a legmagasabb az MRSA aránya, a tesztelt invazív *S. aureus* törzsek 43%-a volt rezisztens methicillinre, azonban ez az érték az előző évi adatokhoz viszonyítva csökkenő tendenciát mutatott. Izlandon a tesztelt izolátumok között nem volt MRSA, Norvégiában pedig az 1%-ot sem érte el, amely a többi országhoz viszonyítva kiemelkedően jó arány (ECDC, 2019). Az Egyesült Királyságban jelentős javulás volt tapasztalható, 2004-ben a *S. aureus* törzsek közel 50%-a volt methicillin-rezisztens, ez 2007-ben 31%-ra, 2009-ben 19,3%-ra csökkent, 2018-ban pedig már a tesztelt izolátumok mindössze 7,3%-a volt MRSA (TIEMERSMA és mtsai, 2004; JOHNSON, 2011). Egy nemzetközi tanulmány szerint általánosan megállapítható, hogy az MRSA előfordulási gyakorisága az intenzív betegellátó osztályokon a legmagasabb (ZINN és mtsai, 2004).

A MRK okozta infekciókat az egyik legnagyobb fenyegetésnek tekinti a közegészségügy az EU/EGT területén. Egy 2010-ben készült tanulmány alapján, az EU-ban az MRSA évente több mint 150000 beteget érintett és 380 millió euró összegű többletköltséget okozott az egészségügyi ellátórendszernek (KÖCK és mtsai, 2010). A European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) adatain alapuló legfrissebb becslések alapján, az EU/EGT-ben, az összes MRK infekció évente több mint 670.000 beteget érint (33000 mortalitás) és körülbelül 1,1 milliárd euró többletköltséget okoz (CASSINI és mtsai, 2019; OECD és ECDC, 2019).

2.7. MRSA az állattenyésztésben és az állati eredetű élelmiszerekben

2.7.1. Az LA-MRSA epidemiológiája és prevalenciája

Napjainkban, a rezisztenciát hordozó *S. aureus* fajok már nem csak az egészségügyben és a közösségekben, hanem az állattartásban, ezáltal az állati eredetű

élelmiszerekben is egyaránt előfordulnak (JUNGWHAN és mtsai, 2017). Korábban, az MRSA törzsek nyomonkövetésének megkönnyítése érdekében, három különböző csoportot hoztak létre a fertőzés helyszíne alapján – egészségügyi ellátással összefüggő (healthcare associated) HA-MRSA, közösségekben szerzett (community-acquired) CA-MRSA és a haszonállatokkal összefüggő (livestock-associated) LA-MRSA. Az izolátumok tipizálási eredményei azonban rámutattak arra, hogy nagymértékű átfedés van a csoportok között, ezért ma már nem érvényes az MRSA epidemiológiai osztályozása (SERGELIDIS és ANGELIDIS, 2017). Az infekció és a törzsek izolálási helyének egyszerűbb meghatározása céljából azonban a szakirodalom mai napig használja eme csoportosítást (BERNIER-LACHANCE és mtsai, 2020). Továbbá, jelenleg is vannak olyan típustörzsek, melyek az adott epidemiológiai osztályban a legjellemzőbbek, ilyen például a CC398-as típus, mely a mezőgazdasági haszonállatokból izolált LA-MRSA törzsek 85%-át teszi ki az EU és az EGT területén (KÖCK és mtsai, 2009; FLUIT, 2012; VERKADE és mtsai, 2013; BOSCH és mtsai, 2015). Az MRSA törzstípusok terjedésükben nem voltak korlátozva, ezért ugyanaz a típus különböző csoportokban (egészségügyi ellátórendszer, közösség, állategészségügy) jelent meg. A HA-MRSA az egészségügyi ellátórendszerből kikerült a közösségbe, a CA-MRSA és LA-MRSA törzsek pedig bejutottak a betegápolásba, ahol sporadikus fertőzéseket és járványokat okoztak (OEP, 2005; VAN RIJEN és mtsai, 2014).

Az első haszonállathoz köthető MRSA törzset egy tőgygyulladásban szenvedő szarvasmarha tejéből azonosították Belgiumban, 1972-ben (DEVRIESE és mtsai, 1972). Az első sertésekből izolált LA-MRSA törzset 2003-ban Franciaországban jelentették, azonban a rezisztens baktériumok, rövid időn belül más haszonállatokban is megjelentek (ARMAND-LEFEVRE és mtsai, 2005). Egy évvel később, 2004-ben már Hollandiában is jelentettek MRSA-val fertőzött sertéseket, a törzstípus bejutott az egészségügyi ellátórendszerbe, ezért 2015-ben a molekuláris tipizálás alapján a humán izolátumok 40%-a LA-MRSA (CC398-as típus) volt (VOSS és mtsai, 2005; BOSCH és mtsai, 2015).

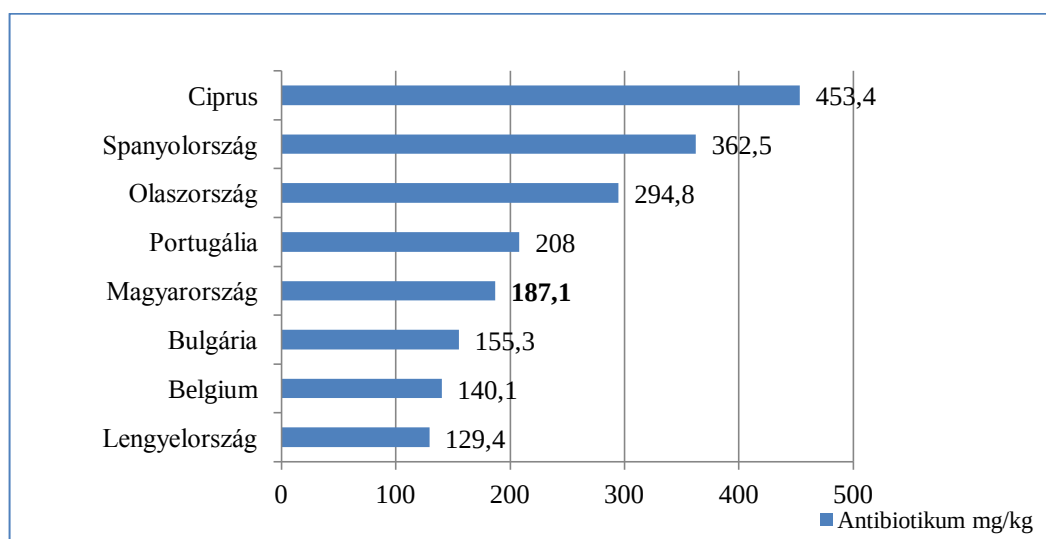
Az EU/EGT területén az LA-MRSA előfordulási gyakorisága változatosan alakul, azonban pontos adat nem áll rendelkezésre, mivel az MRSA monitorozása az állatokban és az állati eredetű élelmiszerekben önkéntes és csak korlátozott számú tagállam vett részt az ellenőrzésben. 2016-ban Írország, Dánia, Belgium és Norvégia szolgáltatott adatokat az állatállomány MRSA érintettségéről. Írország több gazdaság-típusban

különböző állatfajokat tesztelt, beleértve a tejelő teheneket, házi szárnyasokat, kecskéket, nyulakat, juhokat, lovakat, sertéseket, azonban egyik minta sem volt pozitív. Norvégia nagyszámú sertésállományt (n= 872) vizsgált meg, itt az MRSA prevalenciája mindössze 0,1% volt, valamint minden izolátum a CC398-as típusba tartozott. Norvégiában és Dániában a hízósertések mintáiban kimagaslóan magas volt az MRSA prevalenciája. Norvégiában a sertésállomány 57,1%-a, míg Dániában a 87,7%-a volt fertőzött, az izolátumok többsége szintén a CC398-as típusba tartozott (EFSA és ECDC, 2016). Az Egyesült Királyságban 2013-ban számoltak be először CC398-as típusú törzsről, melyet egy pulykából izoláltak, majd 2014-ben öt sertésből is azonosították (ANONYMUS, 2013; HARTLEY és mtsai, 2014, VHT, 2015). 2013 és 2015 között 1000 *S. aureus* izolátum közül mindössze 9 LA-MRSA törzset jelentettek, amely alacsony prevalenciára utal, valamint 2015 óta sem emelkedett számottevően a regisztrált esetek száma (ANJUM és mtsai, 2019). Skóciában 2013 és 2015 között nem jelentettek LA-MRSA fertőzést, azonban 2017-ben azonosítottak egy CC398-as törzset, melyet egy fécánból izoláltak (ANONYMUS, 2017). Németországban, 2000 és 2004 között az LA-MRSA sporadikus megjelenéséről számoltak be, az összes MRSA izolátum 9,6%-át tették ki. A későbbiekben ez az arány azonban drasztikus megnőtt, 2013-ban 35%-ra emelkedett az azonosított LA-MRSA törzsek aránya, mely azóta jelentős mértékben nem változott (VAN ALEN és mtsai, 2017).

2.7.2. Az LA-MRSA kialakulásának lehetséges okai

A rezisztencia kialakulásához elsősorban az antibiotikumok humán és állatgyógyászatban való használata vezet, különösen amennyiben ez az alkalmazás túlzott, vagy nem megfelelően kivitelezett. Az állattenyésztésben sok esetben van szükség van az antibiotikum használatára, ugyanakkor szem előtt kell tartanunk az Állategészségügyi Világszervezet megjegyzését, miszerint a humán betegségeket okozó (zoonotikus) mikroorganizmusok 60%-a állati eredetű (HEALTH FOR ANIMALS, 2020). Európában és a világ többi részén is, az eladott antibiotikumok nagy részét az állatok fogyasztják el. Az Európai Gyógyszerügynökség jelentése alapján 2011 és 2016 között 18,5%-kal esett vissza az antibiotikumok értékesítése az állattenyésztő gazdaságokban, ez 2016-ban átlagosan 129,4 mg hatóanyagot jelent zoomassza kilogrammonként (EMA, 2016).

Cipruson, Spanyolországban, Olaszországban és Portugáliában használnak fel a legtöbb antibiotikumot, ezen országokban több mint 200 mg hatóanyag jut zoomassza kilogrammonként egy állatra. Magyarország közvetlenül Portugália után az ötödik legtöbb antibiotikumot felhasználó ország, alig kevesebb, mint 200 mg/kg a hatóanyag felhasználás. Bulgária, Belgium és Lengyelország esetében is jelentős mennyiségű a hatóanyag felhasználás, a felhasznált antibiotikum értéke mind a három esetben meghaladja a 100 mg/kg-ot (2. ábra).



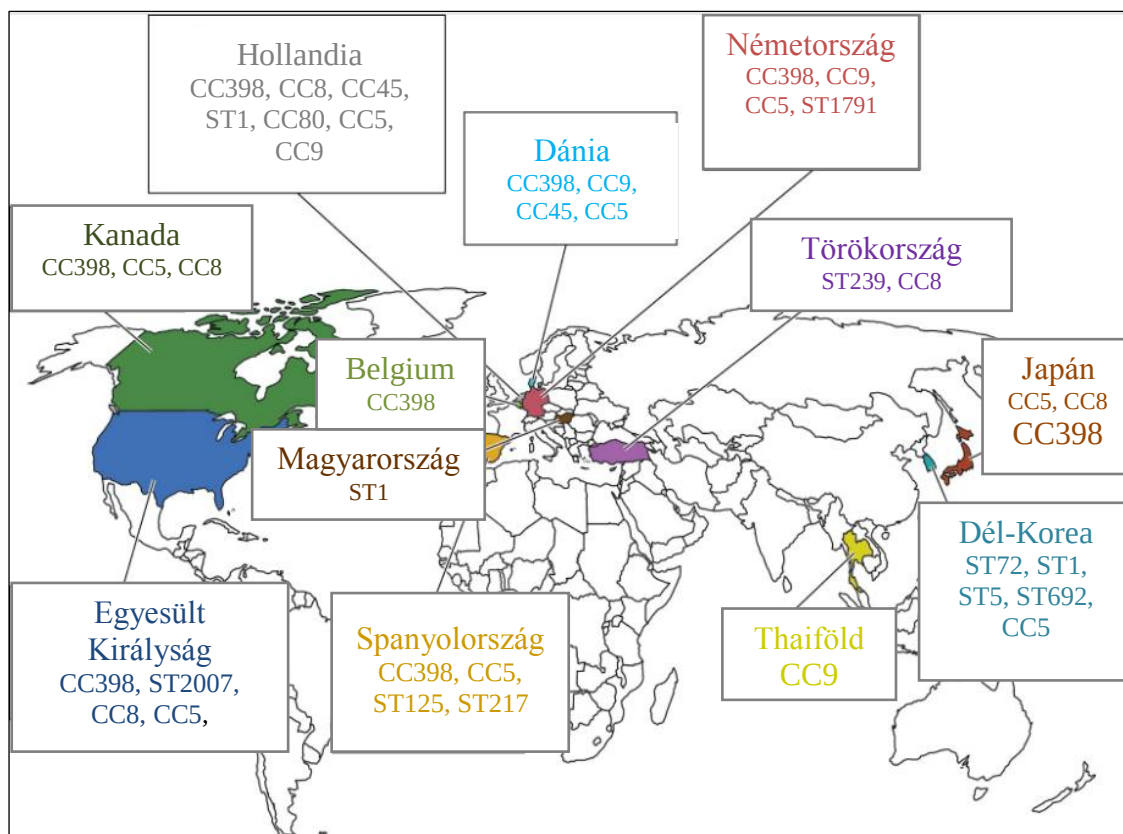
2. ábra Az antibiotikumok állatgyógyászati felhasználása egyes Európai országokban (Forrás: EMA, 2016)

A többi Európai tagállam esetében ez az érték nem éri el a 100 mg/kg mennyiséget, a legkevesebb antibiotikumot Norvégiában használnak fel (2,9 mg/kg) (EMA, 2016). Az országok közötti különbségeknek számos oka lehet, mint az eltérő állatpopuláció és a tenyésztett faj, mely önmagában is nagymértékben képes befolyásolni a felhasznált antibiotikumok mennyiségét, valamint a gazdaságok relatív intenzitása (VERGELY, 2019). Az antibiotikumok hozamnövelés céljából történő felhasználását 2006 óta betiltották az európai állattenyésztésben, azonban néhány esetben továbbra is fennáll a legális felhasználás, mely nagymértékben hozzájárul a rezisztens baktériumok, ezáltal az LA-MRSA törzsek megjelenéséhez. Továbbá, a beteg állatok kezelésén túl, amennyiben fennáll a fertőzés veszélye (intenzív állattartás), prevenciós célokra is alkalmazzák (WISE és mtsai, 1998; MEHNDIRATTA és BHALLA, 2014; VERGELY, 2019).

Az antibiotikum rezisztencia kialakulását azonban más tényezők is befolyásolják. Jelenleg, az EU tagállamaiban a sertéstartásban a cink-oxid gyógyszerként történő alkalmazása engedélyezett az elválasztást követő 14 napban, a hasmenés megelőzése céljából (EMA, 2017). A ZnO népszerű alkalmazása abban rejlik, hogy a hasmenés megelőzésén túl, hozzájárul az antibiotikumos kezelések számának csökkentéséhez is, ezáltal csökkenti a telepi kiadásokat. A cink kiegészítést általában 5-10 napig alkalmazzák és a teljes dózis megközelítőleg 2500 ppm (EURÓPAI BIZOTTSÁG, 2017). Azonban az Európából és Észak-Amerikából származó CC398-as típusú LA-MRSA törzsek vizsgálata során kiderült, hogy a sertésekből származó izolátumokban a cink-rezisztencia génnek (*czrC*) prevalenciája kiemelkedően magas (61-74%), szemben a borjakból (42%) és az emberekből (48%) származó törzsekkel (CAVACO és mtsai, 2010; CAVACO és mtsai, 2011; PRICE és mtsai, 2012; SLIFIERZ és mtsai, 2015a; SLIFIERZ és mtsai, 2015b.). A *czrC* gén a *S. aureus* SSC*mec* mobilis genetikai elemén helyezkednek el, hasonlóan a *mecA* génhez, ezért a magas cinkkoncentráció alkalmazása a takarmányozásban hozzájárulhat az antibiotikum rezisztencia kialakulásához és terjedéséhez (FLUIT és mtsai, 2010). Továbbá, a takarmány növelt ZnO tartalma közvetlenül, más mechanizmuson keresztül is befolyásolja a rezisztencia kialakulását, melyet *Escherichia coli* törzseken bizonyított egy tanulmány (BEDNORZ és mtsai, 2013). A nagy dózisú ZnO alkalmazása és az antibiotikum rezisztencia prevalenciája között magas a korreláció, melyet számos tanulmány igazolt (AARESTRUP és mtsai, 2010; DWEBA és mtsai, 2018). A ZnO-t tartalmazó állatgyógyászati készítmények általános haszonkockázati aránya negatív, mivel az előnyei (kevesebb antibiotikum fogyasztás, hasmenés elleni hatás) nem haladják meg a környezeti kockázatokat, így 2022-ben az Európai Bizottság betiltja a ZnO alkalmazását az Európai Unióban (EMA, 2017).

2.7.3. MRSA az élelmiszerláncban

Az élelmiszerláncban előforduló MRSA törzsek jelenlétéről már számos tanulmány beszámolt, melyek egy része nyers húsmintákból (sertés, baromfihús), másik része pedig állati eredetű élelmiszerekből izolált törzsek vizsgálatát végezte el. A törzsek molekuláris tipizálási eredményei alapján az élelmiszerláncban az MRSA számos típusa van jelen a különböző országokban (3. ábra) (WENDLANDT és mtsai, 2013).



3. ábra Az élelmiszerláncban azonosított különböző klonál komplex (CC) és szekvencia típusú (ST) MRSA törzsek előfordulása (Forrás: WENDLANDT és mtsai, 2013)

Hollandiában 2007-ben 64 nyers sertéshús mintából, melyet 31 különböző üzletből vételeztek, 2 MRSA izolátumot azonosítottak, amelyből az egyik törzs a CC398-as LA-MRSA, míg a másik a USA300 HA-MRSA típusba tartozott (VAN LOO és mtsai, 2007). Két év elteltével, egy másik hollandiai vizsgálat során, 2217 mintából 267 esetben azonosítottak MRSA törzseket, melyek nagy része a CC398-as típusba volt sorolható. Hollandiában végezték el azt az egyedüli tanulmányt, ahol az MRSA jelenlétét birka és bárányhúsban is megvizsgálták. Összesen 324 mintát elemeztek, melyeknek 6,2%-a volt MRSA pozitív, ennek 70%-a pedig CC398-as törzs (DE BOER és mtsai, 2009). Dániából származó 153 sertéshús minta esetében 4,6%-a, míg az import 173 sertéshús minta 7,5%-a volt fertőzött a CC398-as típusú LA-MRSA törzsszel (AGERSØ és mtsai, 2012). Spanyolországban 2009-ben, 318 nyers húsmintából mindössze 1db, sertéshúsból izolált CC398-as típusú törzset azonosítottak (LOZANO és mtsai, 2009). Németországban sertéshúsból, nyers tejből, brojler és pulykahúsból is azonosítottak CC398-as MRSA törzseket (ARGUDÍN és mtsai, 2011). Magyarországon, masztitiszben szenvedő tehenektől származó 595 tejmintából 27 db

ST1-es típusú MRSA izolátumot azonosítottak (JUHÁSZ-KASZANYITZKY és mtsai, 2007). Olaszországban, 160 állati eredetű élelmiszer (tej, tejtermék, hús, húskészítmény) közül 6 MRSA törzset azonosítottak, Pakisztánban 900 db tejmintából 306 törzs esetében volt kimutatható a *mecA* gén, azonban egyik tanulmányban sincs információ a törzsek szekvencia típusáról (NORMANNO és mtsai, 2007; AQIB mtsai, 2017). A sertés-, baromfi-, és marhahússal, valamint a tej és tejtermékekkel ellentétben, kevés tanulmány született az emberi fogyasztásra szánt halak MRSA fertőzőittségéről. Egy malajziai tanulmányban 198 tilápia (*Oreochromis niloticus*) halmintában 98 MRSA törzset azonosítottak, azonban ezeknek a mintáknak a további jellemzői nem ismertek (ATYAH és mtsai, 2010). Koreában is beszámoltak halakból származó MRSA törzsekről, valamint Japánban 175 fogyasztásra kész nyers halból (sashimi) 5 bizonyult MRSA-nak (RHEE és WOO, 2010; HAMMAD és mtsai, 2012).

A *S. aureus* törzsek egyik legfontosabb tulajdonságai közé tartozik a kolonizációs és fertőző képességen túl a gazdaszervezet specifikus adaptáció. Már az 1980-as évek elején fenotípusos vizsgálatokkal bizonyították a *S. aureus* törzsek gazda specifikus specializációját, melyek jellemzően emberekhez, baromfihoz, juhoz, kecskéhez és szarvasmarhához kapcsolódtak (DEVRIESE, 1984). A molekuláris biológiai technikák alkalmazása megerősítette ezeket a korai eredményeket, feltárva, hogy bizonyos genetikai hátterek (klonális vonalak) összefüggést mutatnak a gazdaszervezetekkel. Azonban ezek a vizsgálatok azt is kimutatták, hogy bizonyos klonális vonalak több különböző állatfajhoz és emberhez is képesek adaptálódni (SUNG és mtsai, 2008; CUNY és mtsai, 2010). Az egyik figyelemre méltó példája ennek a haszonállatokban és az élelmiszerláncban leggyakrabban előforduló ST398-as típus, mely elsősorban sertésekhez adaptálódott, azonban később más állatfajokban, valamint az emberekben is okozott megbetegedéseket (VOSS és mtsai, 2005; WITTE és mtsai, 2007). Az ST1-es típus esetében ezt fordított irányban írták le, az elsősorban humán szervezethez adaptálódott típus jelenleg gyakran áll a szarvasmarhák tüdőgyulladásának hátterében (JUHÁSZ-KASZANYITZKY és mtsai, 2007; GRUNDMANN és mtsai, 2010).

Magyarországon a megjelent vizsgálati eredmények elsősorban a mezőgazdasági haszonállatokra korlátozódnak, a forgalomba kerülő élelmiszereket nem vizsgálták. A legtöbb vizsgálatban tüdőgyulladásban szenvedő, vagy tünetmentes illetve egészséges tejelő tehenek tejéről illetve tejéből származó izolátumokat vizsgáltak, melynek legnagyobb része az ST1-es MRSA típusba tartozott. Azonban tekintettel arra, hogy az ST1-es és ST398-as típusú törzseknek humán és számos állatfaj adaptációja is

fennállhat, így nem egyértelműsíthető a fertőző ágens, hiszen az állati eredetű élelmiszerek kontaminációja számos további, különböző módon jöhet létre.

A fertőzött élelemiszertermelő állatok, a vágási folyamatok során (hasítás, zsigerezés stb.) szennyezhetik a tetemeket. Az állatok bőrén jelenlévő MRSA beszennyezheti a vágóhíd környezetét, ezáltal a hasított testeket, valamint a dolgozó személyzetet. A vágási folyamatban résztvevő kolonizált vagy fertőzött személy átviheti a baktériumot a karkaszra és az eszközökre, ezáltal az MRSA bekerülhet az élelmiszer-feldolgozásba (DE BOER és mtsai, 2009; KELMAN és mtsai, 2011). Néhány tanulmány már beszámolt MRSA-val fertőzött készételekről is. Brazíliában, a forgalomba hozott 57 fogyasztásra kész élelmiszerből, 5 izolátum MRSA volt (RIZEK és mtsai, 2011). Portugáliában különféle élelmiszerből izolált 148 koaguláz-pozitív *Staphylococcus* közül 1 db MRSA törzset azonosítottak (PEREIRA és mtsai, 2009).

Jelenleg, az Európai Unióban, az MRSA ellenőrzése az élelmiszerekből és haszonállatokból önkéntes, ezért 2016-ban mindössze 4 ország (Németország, Svájc, Dánia és Spanyolország) jelentett ezzel kapcsolatos információt. Országoként eltérő volt az MRSA prevalenciája, azonban az összehasonlítás során figyelembe kell vennünk, hogy a vizsgálatot eltérő állatfajokból származó húsokból és húskészítményekből izolált törzseken végezték. Spanyolország csak nyúlhúsból izolált törzseket tesztelt, Dánia pedig csak sertéshúst és húskészítményt. Az Európai Unió tagállamai által jelentett adatok alapján azonban elmondható, hogy brojler csirkehúsban, sertéshúsban, nyúlhúsban és pulykahúsban is azonosítottak MRSA törzseket, melyek nagy részét a tipizálási adatok alapján az LA-MRSA típusú törzsek közé csoportosították (EFSA, 2018). Az LA-MRSA törzsek leggyakoribb típusa, a CC398, a humán infekciók kis részét teszik ki és azok is legfőképp szakmai expozíciókra korlátozódnak (állatgyógyászat, intenzív állattartás stb.). Ennek ellenére a CC398-as típusú törzsek virulenciafaktorai lehetővé teszik a magas patogenitást, ezáltal a folyamatos ellenőrzésük az állatokban és az élelmiszerekben elengedhetetlen (AIRES-DE-SOUSA, 2016). A mezőgazdasági haszonállatoktól a forgalomba kerülő élelmiszerekig számos mód nyílik a kontaminációra, azonban az MRSA szekvencia típusaiból legfeljebb csak következtetni tudunk a fertőző ágensre az adott szekvencia típus adaptációs képességét figyelembe véve. Jelenleg a teljes genom szekvenálás, a teljes genom MLST (wgMLST), a maggenom (cgMLST), vagy az SNP-k (egypontos nukleotid polimorfizmusok) populáció szinten történő vizsgálatai adhatnának választ

azokra a kérdésekre, hogy több izolátumból milyen leszármazási viszonyok képezhetők le, azaz hogy a fertőzés klonalitása felmérhető legyen.

2.8. A *Staphylococcus* fajok meghatározásának módszerei

A *Staphylococcus* genus tagjainak elkülönítése és azonosítása a fajok eltérő mértékű patogenitása és gazdaspecifitása miatt elengedhetetlen. A koaguláz-pozitív *Staphylococcus* fajok közül a legtöbb nozokómiális infekció és enterotoxin okozta ételmérgezés a *S. aureus* fajhoz köthető. Azonban a közelmúltban meghatározott *S. aureus* komplex fajainak elkülönítése és azonosítása kihívást jelent mind a klinikai, mind az állategészségügyi, mind az élelemiszer-mikrobiológiai diagnosztika területén.

A koaguláz-pozitív *Staphylococcus* fajok számának meghatározására, az élelmiszerek mikrobiológiai kritériumairól szóló, 2005. november 15-i 2073/2005/EK rendelet az „Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. Horizontális módszer a koagulázpozitív sztafilokokkuszok (*Staphylococcus aureus* és más fajok) számának meghatározására” című, MSZ EN ISO 6888-1:2008-as szabvány használatát írja elő az állati eredetű termékek vizsgálatára. Ebben a horizontális módszerben, egy szelektív táptalaj, a kálium-tellurit és tojássárga emulzióval kiegészített Baird-Parker agar alkalmazását javasolja, melynek értékelése 24-48 órás, 35-37 °C-on végzett aerob tenyésztést követően végezhető el. A jellegzetes, fekete vagy szürke, fényes és domború telepeket, melyeket részben opálos feltisztulási zóna vesz körül, megerősítő vizsgálatnak (koaguláz-próba) kell alávetni. A kiválasztott telepek Columbia véres agarra átváltoztatva jellegzetes morfológiát mutatnak. Szabályos, kerek fényes, sima felszínű szürkésfehér vagy porcelánfehér, esetleg aranysárga színű telepek nőnek a táptalajon, 35-37 °C-on végzett 24 órás tenyésztést követően, melyeket hemolitikus (β -hemolízis) udvar vesz körül. A bizottsági rendelet által javasolt szabvány célja tehát nem az azonosítás, így nem is lehetséges ezek alapján a fajok azonosítása, és nem tér ki az antibiotikum rezisztencia feltérképezésére sem.

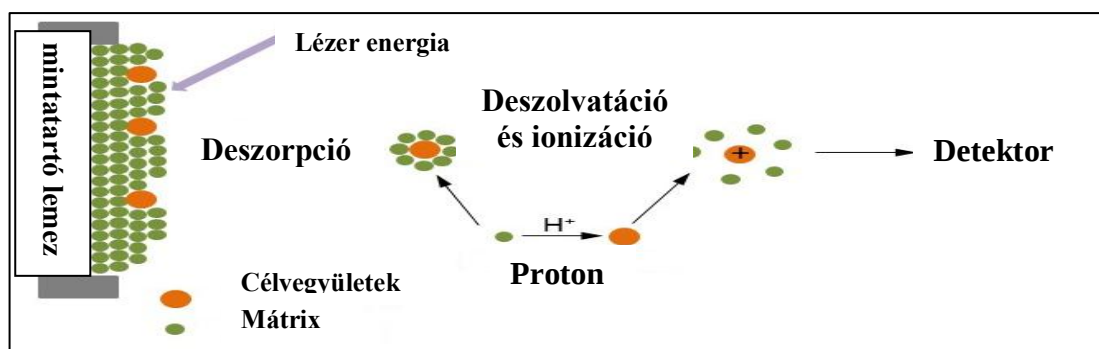
A legtöbb esetben a *S. aureus* faj azonosítását latex agglutinációs tesztekkel szokták elvégezni a rutin mikrobiológiai diagnosztikában. A latex agglutinációs tesztek lehetővé teszik a clumping faktor, a protein A, és a kapszuláris poliszacharidok kimutatását, fibrinogénnel és IgG-vel szintetizált latex segítségével. A „SAC” két új fajában – *S. argenteus*-ban és a *S. schweizteri*-ben – található protein A fehérjék szekvenciái azonban nagymértékű hasonlóságot mutatnak a *S. aureus* protein A fehérjével. A *S.*

argenteus fajban 95%-os, míg a *S. schweitzeri* fajban 79%-os az egyezés (HOLLEN, 2016). Ezáltal, a szabad koaguláz kimutatásán alapuló teszttel a *S. aureus* elkülöníthető a többi koaguláz-pozitív *Staphylococcus* fajtól, azonban a „SAC” fajaitól nem.

2.8.1. MALDI-TOF MS technika alkalmazása a mikroorganizmusok azonosításában

A mátrix-asszisztált lézer deszorpció ionforrás és repülési idő tömeg analizátor összekapcsolásán alapuló tömegspektrometriás módszer, a MALDI-TOF MS technika alapvetően változtatta meg a bevált mikrobiológiai diagnosztikai tesztelési rutint világszerte. Több mint 100 éven keresztül a mikrobákat fenotípusos és biokémiai tulajdonságaikkal jellemezték, illetve a növekedéshez és az anyagcseréhez szükséges szubsztrátok alapján. Új faj felfedezése esetén komplexebb azonosítási algoritmusokra volt szükség, ezért elterjedtek a referenciakönyvek, melyek részletes azonosítási táblázatokat tartalmaztak az adott kórokozóra. Az elmúlt 20 évben egy adott gén vagy DNS szakasz bázissorrendjének meghatározásán alapuló technikák lehetővé tették a mikroorganizmusok pontosabb azonosítását, újra- és átsorolását, azonban ezek a módszerek jelentős technikai beruházásokkal és költségekkel jártak. Mindazonáltal a szekvenciák meghatározásán alapuló technikák nem voltak alkalmasak a rutin diagnosztikára, mivel jelentős szaktudásra és beruházásra volt működtetésükhöz szükség, azonban jelentősen hozzájárultak a MALDI-TOF MS adatbázisok megalapozásához, ezáltal lehetővé téve a kórokozók későbbi pontos identifikálását. A MALDI-TOF MS technika által jelentett egyszerűség és megbízhatóság oda vezetett, hogy jelenleg ezt a technikát már a világ számos országában alkalmazzák mikroorganizmusok azonosítására (MURRAY, 2012; KYOUNG-SOON és YOUNG HWAN, 2018).

A mérés során a célvegyületet egy mátrixnak nevezett energia-abszorbens szerves vegyület oldatával keverik össze, mely a kiszáradását követően a mintával együtt kikristályosodik. Az ionizáció során a lézer energiáját a mátrix nyeli el, majd ez ionizálja a célvegyületeket. A protonált ionokat rögzített potenciálon gyorsítják és a térmentes tartományban a detektorba jutnak (4. ábra). Az ionok tömegszám szerinti szeparációja a detektorba jutott ionok repülési idejének pontos mérése alapján történik. A mérés során a mintából származó peptid-tömeg ujjlenyomatnak (peptide mass fringerprint – PMF) is nevezett tömegspektrum jön létre (MURRAY, 2012).



4. ábra A MALDI-TOF MS technika működési elve (Forrás: CREATIVE PROTEOMICS, 2020)

A mikrobák automatikus azonosítása során, a mintából származó tömegspektrumot a szoftver az adatbázisában lévő ismert kórokozók referencia tömegspektrumaival veti össze. A fajok, alfajok azonosítása során általában a 2-20 kDa közötti mérési tartományt alkalmazzák, amely főként a riboszómális, fajspecifikus fehérjék detektálására alkalmas (MURRAY, 2012). A szorosan rokon törzsek, mint a „SAC” fajtái, hasonló tömegspektrumot adnak, azonban a spektrumok kisebb, de reprodukálható fajspecifikus csúcsai alapján megkülönböztethetők (SIEGRIST és mtsai, 2007; GIEBEL és mtsai, 2008; WOLTERS és mtsai, 2011).

2. táblázat: JOSTEN és mtsai, (2013) és SCHUSTER és mtsai, (2017) által meghatározott *S. aureus* specifikus csúcsok

Faj	Fehérje/gén megnevezés	Aminosav szekvencia	m/z
<i>S.aureus</i>	PSM-alpha-4 (FD747_02505)	MAIVGTIIKI IKVIIDIFAK	2201
<i>S.aureus</i>	PSM-alpha-2	MGIIAGIHKF IKGLIEKFTG K	2307
<i>S.aureus</i>	PSM-alpha-3	MEFVAKLFKF FKDLLGKFLG NY	2685
<i>S.aureus</i>	Uncharacterized protein (SA2420.1)	MKKLAVILTL VGGLYYAFKK YQERVNQAPN IEY	3875
<i>S.aureus</i>	SAR1012	MRQFIKRTVK TILVGYVIKF IRNKLSGKSS HPTDNKHN	4485
<i>S.aureus</i>	SAR1012	MRQFIKRIVK TILVGYVIKF IRNKLSGKSS HPTDNKHN	4497
<i>S. aureus</i>	<i>graF</i> (SAS030)	SNENQNKKAA EKAKEVEEKL KDKKEVKTED INQTKQDIQD TLN	5002
<i>S.aureus</i>	SAS049	SFMDKAKDAV EKFKNSDNEQ VKNVKDKINE	5507
<i>S.aureus</i>	SAS049	SFMDKAKDAV EKFKNSDNEQ VKNVKDKINE YTGSNNEEKK ENEDKEK	5525
<i>S.aureus</i>	SAS049	SFMDKAKDAV EKFKNSDNEQ VKNVKDKINE YTGSNNEEKK ENEDKEK	5539
<i>S.aureus</i>	SAS049	SFMDKAKDAV EKFKNSDNEQ VKNVKDKINE YTGSNNEEKK ENEDKEK	5551
<i>S.aureus</i>	<i>rpmD</i>	AKLQITLTRS VIGRPETQRK TVEALGLKKT NSSVVVEDNP AIRGQINKVK HLTVEEK	6423
<i>S.aureus</i>	SA1452	ADESKFDQFK GNVKETVGNV TDNKELEKE G QQDKATGKAKEVVENAKNKITDAIDKLKK	6552

3. táblázat: JOSTEN és mtsai, (2013) és SCHUSTER és mtsai, (2017) által meghatározott specifikus csúcsok a *S. aureus* klonális komplex fajainak elkülönítésére

Faj	Fehérje/gén megnevezés	Aminosav szekvencia	m/z
<i>S. aureus</i> / <i>S. argenteus</i> / <i>S. schweitzeri</i>	PSM-alpha-1	MGIAGIHKV IKSLEQFTGK	2289
<i>S. aureus</i> / <i>S. argenteus</i> / <i>S. schweitzeri</i>	PSM-alpha-3 (<i>psma3</i>)	MEFVAKLFKF FKDLLGKFLG NN	2636
<i>S. aureus</i> / <i>S. argenteus</i> / <i>S. schweitzeri</i>	Delta-hemolysin (<i>hld</i>)	MAQDIISTIS DLVKWIIDTV NKFTKK	3007
<i>S. aureus</i> / <i>S. argenteus</i> / <i>S. schweitzeri</i>	Uncharacterised protein (SA2420.1)	MKKLAVILTL YQERVNQAPN IEY VGGLYYAFKK	3891
<i>S. aureus</i> / <i>S. argenteus</i> / <i>S. schweitzeri</i>	50S ribosomal protein L36 (<i>rpmJ</i>)	MKVRPSVKPI GKVVMVICENP KHKQRQG CEKCKVIKRRK	4306
<i>S. aureus</i> / <i>S. argenteus</i> / <i>S. schweitzeri</i>	Exinuclease ABC subunit A (<i>uvrA</i>)	GPEGGSGGGT IVATGTPEDI AQTKSSYTGK YLKEVLERDK QNTEDK	4814
<i>S. aureus</i> / <i>S. argenteus</i> / <i>S. schweitzeri</i>	Uncharacterized protein (<i>rpmF</i>)	AVPKRRTSKT ISVPGMTECP VCKNCGSYNG EEVAAK RKNKRRTHFK NCGEYKLSHR	6354
<i>S. argenteus</i>	SA0772	ADESKFEQAK TDNKNLENEG KEDKASGKAK GNVKETVGNV	6889
<i>S. aureus</i> / <i>S. argenteus</i> / <i>S. schweitzeri</i>	50S ribosomal protein L29 (<i>rpmC</i>)	MKAKEIRDLT SKEELFNLR ARIRTVRKTI EIEQSKANQ TSEIEEQIKS QLATGQLEET ARLKTVARER	8091
<i>S. aureus</i> / <i>S. argenteus</i> / <i>S. schweitzeri</i>	<i>rpsT</i> (SA1414)	ANIKSAIKRV ISQKSAMRTA NADNKNELVS QSNLIHSNKA DRIKSQLMTA NK KTTEKAEARN VKNAKTAVSN LAVKLVKAA	8891
<i>S. aureus</i> / <i>S. argenteus</i> / <i>S. schweitzeri</i>	DNA-binding protein HU (<i>hup</i>)	MNKTDLINAV AGSAVDVFE KVQLIGFNG AEQADLTKEE SIQNSLAKGE	9627
<i>S. aureus</i> / <i>S. argenteus</i> / <i>S. schweitzeri</i>	<i>rpsP</i> (SA1081)	AVKIRLTRLG VADARSPRDG RIIEQIGTYN SKRNPFFYRIV	10105
<i>S. schweitzeri</i>	<i>graF</i> (SAS030)	SNENQNKKAT KDKKEVKTED INQTKQDIQDT LN EKAKEVEEKL	5045
<i>S. schweitzeri</i>	<i>graC</i> (SAS044)	PIVNVKLEGG SEVTDVEKT VIEEMKPNHY GVAGVRKSDQ RSDEQLKNLV TGANRQAIHV	6613
<i>S. argenteus</i> / <i>S. aureus</i>	Delta-toxin	MAQDIISTIS DLVKWIIDTV NKFTKK	3037
<i>S. argenteus</i>	SA1452	ADESKFDQFK TDNKELEKEG EVVENAKNKI TDAIDKLK GNVKETVGNV QQDKATGKAK	6580

A *S. aureus* fajra, valamint a különböző klónvonalakra specifikus csúcsokhoz tartozó fehérjék azonosítását JOSTEN és mtsai, (2013) végezték el. Ezen tanulmány alapján SCHUSTER és mtsai, (2017) a *S. argenteus*, *S. schweitzeri* és *S. aureus* azonosítására és elkülönítésére specifikus csúcsokat határozott meg (2., 3. táblázat). A vizsgálat során mindössze 11 csúcs volt azonosítható mind a három fajban, emellett meghatároztak 2 *S. argenteus*, 13 *S. aureus* és 2 *S. schweitzeri* specifikus csúcsot, valamint 1 olyan csúcsot, mely csak a *S. argenteus* és *S. aureus* fajok tömegspektrumában volt detektálható.

A meghatározott csúcsok alapján, MALDI-TOF MS technikával könnyen és gyorsan elkülöníthetővé válik a három faj. Azonban mint minden vizsgálati módszer esetén, ebben a technikában is kiemelkedően fontos elvárás a reprodukálhatóság, hiszen a kísérleti tényezők megváltoztatása ugyanazon baktérium faj eltérő spektrumprofilját eredményezi, és a nem megfelelő minőségű spektrum megbízhatatlan azonosításhoz vezethet (GIEBEL és mtsai, 2010; FERRONI és mtsai, 2010). A faj és alfaj szintű azonosítás során ezért alapvető fontosságú az alkalmazott minta-előkészítési módszer spektrumminőséget és reprodukálhatóságot maximalizáló, mérhető mennyiségi paramétereinek kiértékelése. A kísérleti paraméterek közül a detektálási mód, a mátrix, a szárítási idő és inkubációs periódus spektrumminőségre gyakorolt hatásait már széles körben tanulmányozták (WALKER és mtsai, 2002; JACKSON és mtsai, 2005). Kevés tanulmány született azonban a tenyésztési körülmények és a minta-előkészítési módszerek *S. aureus* spektrumokra gyakorolt hatásairól (FERRONI és mtsai, 2010; LA SCOLA, 2011).

A MALDI-TOF MS technikát a mikrobiológiai diagnosztika számos területén alkalmazzák Európában. A gyors azonosítás elengedhetetlen része a sikeres terápiának, ezért egyre nagyobb teret nyer a humán és állatgyógyászati klinikumban is. A technika alkalmazásának lehetőségeit számos területen kutatják, így például használható lehet a DNS és az RNS elemzésére, antibiotikum rezisztencia meghatározására és egyéb proteomikai analízisre egyaránt (NAGY és mtsai, 2014).

2.9. A *S. aureus* törzsek methicillin-rezisztenciájának meghatározása

Az MRSA törzsek azonosításában jelenleg a molekuláris biológiai módszerek a legmegbízhatóbbak, de a fenotípusos módszerek, a tenyésztésen alapuló vagy agar diffúziós módszerek egyaránt nélkülözhetetlenek a rutin diagnosztikában (YANG és mtsai, 2010; AGHAMALI és mtsai, 2017), melyet napjainkban kezdett el kiegészíteni a tömegspektrometrián alapuló a MALDI-TOF MS technika.

2.9.1. Fenotípusos vizsgálati módszerek

Az élelemiszer-mikrobiológiában és a klinikumban a patogén törzsek kimutatására a protokollban szelektív és differenciáló tápközegeket alkalmaznak. A szelektív tápközeg összetétele az azonosítani kívánt mikrobák növekedéséhez biztosít kedvező feltételeket

úgy, hogy más mikroorganizmusok növekedését lassítják, illetve megakadályozzák. A differenciáló tápközegek különböző indikátort tartalmaznak, melyek a mikrobák anyagcseretermékeivel látható reakciót adnak, ezáltal azonosíthatók és elkülöníthetők egymástól a mikrobák. A közelmúltban azonban létrehoztak olyan tápközegeket, melyek a mikrobák enzimtevékenysége alapján teszik lehetővé az azonosítást. Az ilyen új típusú tápközegek közé tartoznak a kromogén táptalajok, melyek színeképző (kromogén) komponense reakcióba lép a mikroba specifikus enzimeivel vagy anyagcseretermékeivel, ezáltal az adott tulajdonságot hordozó mikrobák telepei eltérő színnel nőnek a táptalaj felületén (BELÁK és mtsai, 2011). Az MRSA azonosítására szolgáló kromogén táptalajok egyéb baktériumokra és élesztőkre, gombákra ható keveréket, valamint optimalizált sókoncentrációt tartalmaznak. Ez az összetétel megakadályozza az élesztők, valamint a legtöbb Gram-negatív és pozitív baktérium növekedését, a methicillinnel szemben rezisztens *Staphylococcus* törzsek kivételével (YANG és mtsai, 2010).

Számos kromogén táptalaj létezik, melyeket a Klinikai és Laboratóriumi Szabványügyi Intézet (CLSI) a rutin diagnosztikában elfogadott az MRSA törzsek szűrésére; ezek megfelelő érzékenységi és megbízhatósági szinttel rendelkeznek (COLAKOGLU és mtsai, 2007; CLSI, 2019). A leggyakrabban alkalmazott kromogén táptalajok szenzitivitása és specificitása igen magas, ezért biztonságosan alkalmazhatóak az MRSA törzsek azonosításában (4. táblázat). Az inkubációs idő változó a különböző gyártók által kínált táptalajok esetében, de általában 35-37 °C-on, 24 órás tenyésztési időt igényelnek.

4. táblázat: A kereskedelmi forgalomban lévő kromogén táptalajok összehasonlítása

Táptalaj	Gyártó	Jóváhagyott minta	Szenzitivitás	Specificitás	Inkubációs idő (h)
ChromoID MRSA agar	BioMerieux, Inc	Orrváladék	100	100	24
CHROMagar MRSA	CHROMagar	Vérminták	96-97,6	99,9-100	18-24
BBL CHROMagar MRSA II	BD	Orrváladék, Vérminták	100	100	20-26
Spectra MRSA	Remel	Orrváladék, vérminták	96	99,4	24
HardyCHROM MRSA	Hardy Diagnostics	Orrváladék	100	100	24
MRSASelect	Bio-Rad	Orrváladék	98,3	98,2	18-28

Forrás: AGHAMALI és mtsai, (2017)

A rutin diagnosztikában a kromogén táptalajok alkalmazása mellett, az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok leggyakoribb módszere a korongdiffúzió, mely során antibiotikummal átitatott szűrőpapírkorongokat alkalmaznak a rezisztencia azonosítására. Számos tanulmány megerősítette, hogy a *S. aureus* esetében, a cefoxitin indukálja a leghatékonyabban a rezisztenciáért felelős *mecA* gén expresszióját, a többi penicillin és penicillináz-rezisztens penicillinekkel szemben (SKOV és mtsai, 2003; BOUTIBA-BEN és mtsai, 2004; URBASKOVA és mtsai, 2004). Továbbá a cefoxitin rezisztencia az oxacillin érzékenység vizsgálatára is szolgál, ezért a cefoxitin rezisztens törzseket MRSA-nak kell tekinteni (TÓTH és mtsai, 2014). A CLSI Antimikrobális Szerek Érzékenységi Vizsgálatával foglalkozó európai albizottsága (Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing) 2004-ben fogadta el a cefoxitin teszt alkalmazását, a *mecA* mediált oxacillin rezisztencia előrejelzésére (NCCLS, 2004).

2.9.2. Genotípusos vizsgálati módszer

Az MRSA genotípusos módszerekkel történő azonosítása az utóbbi évtizedben rohamléptekkel fejlődött. A *mecA* gén kimutatásán alapuló, klasszikus PCR alapú azonosítása egy olyan általánosan elfogadott eljárás, mely során az eredmény akár egy napon belül elérhetővé válik (TRINDADE és mtsai, 2003; MOHANASOUNDARAM és LALITHA, 2008). A PCR módszer szenzitivitása és specifitása nyilvánvalóan magasabb, mint a fenotípusos vizsgálati módszereké, azonban nem alkalmas az MRSA azonosítására kevert, különböző mikroorganizmusokból álló tenyészetekből (TÜBBICKE és mtsai, 2012; ERMENLIEVA és mtsai, 2016). A mobilis geneitkai elemeknek köszönhetően, számos koaguláz-pozitív *Staphylococcus* faj hordozhatja a *mecA* gént, ezáltal diagnosztikai szempontból könnyen fals-pozitív eredményt adhat (LOUIE és mtsai, 2002). A *S. sciuri* törzsek közül néhány izolátum *mecA* génnel azonos fragmensét felismerhetik a PCR technika során alkalmazott specifikus primerek (MAES és mtsai, 2002). Másrészt, azonban a PCR technika lehetővé teszi a SCC*mec* típusok megkülönböztetését, melynek járványügyi szempontból kimagasló jelentősége van (BOYE és mtsai, 2007; MILHEIRIC és mtsai, 2007).

2.9.3. MALDI-TOF MS technika alkalmazása az MRSA törzsek azonosításában

A MALDI-TOF MS technika azon túl, hogy forradalmasította a mikroorganizmusok azonosítását, hozzájárulhat az antibiotikum rezisztencia feltérképezésének felgyorsításában is. Az ezredfordulón a legnagyobb népegészségügyi jelentősége rezisztencia szempontjából az MRSA baktériumoknak volt, ezért az első MALDI-TOF MS technikával történő antibiotikum érzékenységi vizsgálatot ezeken a törzseken végezték el (EDWARDS-JONES és mtsai, 2000). A 2000-es évek eleje óta számos tanulmány számolt be olyan specifikus fragment ion csúcsokról, melyek segítik, illetve lehetővé teszik a MSSA és MRSA gyors elkülönítését, melyeket általában az antibiotikum rezisztens és érzékeny *S. aureus* törzsek tömegspektrumainak különbségei alapján határozták meg.

A korábbi tanulmányokban leírt fragment ion csúcsok nagy részét humán törzsek vizsgálata alapján határozták meg, a legtöbb esetben alkalmazott minta-előkészítési módszer a direkt mintafelvitel volt (5. táblázat). Jelenleg nincs olyan leírt specifikus fragment ion csúcs, mely 100%-os specificitással és szenzitivitással képes diszkriminálni az MRSA és MSSA törzseket.

Néhány tanulmányban az elkülönítés alapjául szolgáló csúcsokhoz tartozó fehérjéket szekvencia alapú vizsgálatokkal azonosították. JOSTEN és mtsai, (2014) antiszensz RNS technológia segítségével megállapította, hogy a 2414 m/z csúcs a PSM-mec expressziójával korrelál, amelynek jelenléte az MRSA törzsekre jellemző. PRANADA és mtsai, (2016) igazolták a 2414 m/z csúcs alkalmazhatóságát a diszkriminációban. A vizsgálatba vont 211 MRSA törzs 23,2%-ában tudták detektálni a specifikusnak mondott fragment ion csúcsot, miközben ez a szintén analizált 1093 MSSA törzs egyikében sem jelent meg. SOGAWA és mtsai, (2017) egy másik fehérjét írtak le, amely elősegítheti az elkülönítést. Ez a 3043 m/z fragment ion csúcs volt, mely a szekvenálási eredményeik alapján a PBP2a fehérje egyik fragmentuma. Ezidáig a 3043 m/z csúcs alkalmazhatóságáról még nem számolt be másik tanulmány.

5. táblázat: Előző tanulmányokban meghatározott specifikus fragment ion csúcsok

Tanulmány	MRSA specifikus fragment ion csúcs (m/z)	Vizsgált minta	Minta-előkészítési módszer
EDWARDS-JONES és mtsai, (2000)	2127	referencia törzsek klinikai izolátumok	direkt mintafelvétel
JOSTEN és mtsai, (2014)	2414	humán izolátumok	direkt mintafelvétel hangyasavval
SOGAWA és mtsai, (2017)	3043	humán izolátumok	direkt mintafelvétel
JUNG-MIN és mtsai, (2019)	4607	humán izolátumok	nincs adat
KWON és mtsai, (2017)	5070	humán izolátumok	etanolos extrakció
CHARYULU és mtsai, (2012)	6576	humán izolátumok	direkt mintafelvétel
CHARYULU és mtsai, (2012)	6885	humán izolátumok	direkt mintafelvétel
JUNG-MIN és mtsai, (2019)	9216	humán izolátumok	nincs adat
MANUKUMAR és UMESHA (2017)	9632	élelmiszerből izolált törzsek	direkt mintafelvétel hangyasavval
KWON és mtsai, (2017)	10152	humán izolátumok	etanolos extrakció

A *S. aureus* törzsek nagy variabilitása (eltérő klónvonalak és virulenciafaktorok) megnehezíti a methicillin-rezisztencia biomarkereinek meghatározását az antibiotikum rezisztens és az érzékeny törzsek tömegspektrumainak összehasonlítása alapján. Továbbá, a tanulmányok nagy részét a SAC új fajainak (*S. argenetus* és *S. schweitzeri*) azonosítását megelőző időszakban végezték el, ezért a fehérjeprofilban megjelenő különbségek ebből is adódhattak. A *S. aureus* methicillin-rezisztenciájának MALDI-TOF MS technikával történő biztonságos azonosításához szükség van újabb biomarkerek feltárására, valamint a korábban meghatározott specifikus csúcsok tesztelésére.

2.10. A *S. aureus* törzsek szekvencia alapú tipizálásának módszerei

A *S. aureus* törzsek jellemzésére többféle molekuláris tipizálási módszert fejlesztettek ki, ideértve a pulzáltatott mezejű gélelektroforézist (pulsed-field gel electrophoresis – PFGE), a multilokus szekvencia tipizálást (multilocus sequence typing – MLST) és a *Staphylococcus* protein A gén (staphylococcal protein A gene –

spa) tipizálást (ENRIGHT és mtsai, 2000; HARMSSEN és mtsai, 2003; McDOUGAL és mtsai, 2003). Járványügyi és epidemiológiai szempontból a *S. aureus* fajon belül elkülöníthető klonális vonalak azonosítása meghatározó jelentőséggel bír. A klonális vonalak időben és térben való figyelemmel kíséréséhez azonban egy olyan egységes osztályozó rendszert kellett kialakítani, mely lehetővé tette a különböző laboratóriumokban kapott eredmények összehasonlítását (O'HARA és mtsai, 2016).

A *S. aureus* fajok epidemiológiai vizsgálatához széles körben alkalmazták a PFGE molekuláris tipizálási módszert, mely sikeresnek bizonyult a nozokómiális járványokat okozó, klonális vonalak azonosításában (RICHARDSON és REITH, 1993; BANNERMAN és mtsai, 1995; COX és mtsai, 1995). A PFGE, és minden olyan módszer, mely a gélek DNS fragmentum mintáinak összehasonlításán alapul, megnehezíti a különféle laboratóriumok eredményeinek összevetését. A módszer robusztusságának hiánya miatt előfordulhatott, hogy a klonális vonalak genetikai rokonságával kapcsolatban a különböző laboratóriumok különböző eredményre jutottak. Emellett nagy szükség volt egy olyan módszer bevezetésére, mely a klonális vonalak egyértelmű azonosítását úgy teszi lehetővé, hogy nincs szükség az adott vizsgálatban alkalmazott referencia törzsek beszerzésére vagy cseréjére (ENRIGHT és mtsai, 2000).

Az MLST egy rendkívül jó felbontóképességű módszer, mely a baktériumfajok hét háztartási génjének PCR-rel felszaporított, megközelítőleg 450 bázispár hosszúságú, DNS fragmentumainak szekvenciátípus meghatározása alapján jellemzi a törzseket. A hét lókuszon több allél található és az adott törzsre jellemző allélvariánsokat az adatbázisokban található szekvencia-variánsokkal vetik össze, melynek alapján meghatározzák a szekvencia típust (ST). Továbbá, közös klonális komplexbe (CC) sorolhatók azok a szekvencia típusok, melyek öt háztartási génje azonos allélprofilba tartozik (MAIDEN és mtsai, 1998). Az elérhető adatbázisoknak köszönhetően, a különböző laboratóriumok eredményei könnyen összehasonlíthatóvá válnak, továbbá az MLST által gyűjtött adatok felhasználhatók a *S. aureus* fajok evolúciós és populációbiológiai kérdések megválaszolására (FEIL és mtsai, 1999; SPRATT, 1999).

Az *spa* tipizálás nagymértékben hasonlít az MLST-hez és számos tanulmány alapján ez a módszer is alkalmas az evolúciós összehasonlító és epidemiológiai vizsgálatokra (KOREEN és mtsai, 2004; HALLIN és mtsai, 2007; STROMMINGER és mtsai, 2008). Az *spa* gén három különálló régiót tartalmaz, az Fc, X és C régiót, azonban az *spa* tipizálás során, csak egy lókuszt, az *spa* gén polimorf X régiójának szekvencia tipizálása történik (VERWEY, 1940; HARMSSEN és mtsai, 2003; GOUDARZI és

mtsai, 2016). A polimorf X régió, amely minden *S. aureus* törzsben jelen van, egy 240 bázispár hosszúságú szekvencia, melyben az aminosavak kapcsolódási sorrendje egyedi és ismétlődő változásokat tartalmaz, ezáltal kiválóan alkalmas a törzsek elkülönítésére (MAZI és mtsai, 2015). Az *spa* tipizálás során, mivel csak egy lókusz szekvenálását hajták végre, az eljárás költséghatékonyabb, időtakarékosabb és kevesebb a hiba lehetősége az MLST-hez viszonyítva (PEACOCK és mtsai, 2002).

3. SAJÁT VIZSGÁLATOK

3.1. Anyag és módszer

3.1.1. *Vizsgálati helyszínek és időpontok*

Vizsgálataimat 2017 decemberében 4 különböző helyszínen kezdtem el. Egyrészt a MikroMikoMed Kft. humámdiagnosztikai laboratóriumában végeztem az izolátumok minta-előkészítését, amelyet később, a protokoll kidolgozását követően a WESSLING Hungary Kft. mikrobiológiai laboratóriumában folytattam. A törzsek MALDI-TOF MS elemzését a WESSLING Hungary Kft. mikrobiológiai laboratóriumában, míg a molekuláris biológiai vizsgálatokat a BIOMI Kft. laboratóriumában végeztem. Az élelmiszerekből izolált *Staphylococcus* törzsek enterotoxin génjeinek vizsgálatára, 2019. júniusában került sor, az Állatorvostudományi Egyetem Lógyógyászati Tanszék és Klinika laboratóriumában.

3.1.2. *A mikrobiológiai vizsgálatok során alkalmazott táptalajok*

- **Baird-Parker agar** (Biokar, Fr): Készen vásárolt táptalaj, melynek összetétele: tripton 10 g/l, kazein hidrolizátum 10 g/l, marhahús kivonat 5 g/l, élesztő 1 g/l, lítium-klorid 5 g/l, glicin 12 g/l, nátrium-piruvát 10 g/l, agar 15 g/l, szulfametazin 50 mg/l, tojássárga tellurit emulzió 47 ml/l. Analitikai mérlegen bemértem 58 g Baird-Parker agart melyet 950 ml ioncserélt vízben elszuszpendáltam és 121 °C-on 15 percig sterilizáltam autoklávban. A szuszpenziót 45 °C-ra hűtöttem és hozzáadtam a tojássárga tellurit emulziót. Steril Petri-csészébe öntöttem és vízszintes helyzetben hagytam megdermedni.
- **Columbia véres agar** (Neogen, UK): Készen vásárolt táptalaj, melynek összetétele: kazein hidrolizátum 10 g/l, hús kivonat 5 g/l, szív kivonat 3 g/l, élesztő 5 g/l, kukoricakeményítő 1 g/l, nátrium-klorid 5 g/l, agar 12 g/l. Analitikai mérlegen bemértem 42 g Columbia agart melyet 1 l ioncserélt vízben elkevertem és 121 °C-on 15 percig sterilizáltam autoklávban. A szuszpenziót 50 °C-ra hűtöttem és 0,3 nm-es szűrőn keresztül beleszűrtem 4g defibrinált birkavért és elkevertem. A 45 °C-ra lehűtött táptalajt steril Petri-csészébe öntöttem és vízszintes helyzetben hagytam megdermedni.

- **Mueller Hinton agar** (Oxoid, UK): Készen vásárolt szabványos összetételű szilárd táptalaj 90 mm-es Petri-csészében, melynek összetétele: marhahús kivonat 3 g/l, kazein hidrolizátum 17,5 g/l, keményítő 1,5 g/l, agar 17 g/l.
- **Csokoládé agar** (Oxoid, UK): Általam készített táptalaj, melynek összetétele: 1 l ioncserélt víz, 42 g Columbia agar, 4 g defibrinált birkavér. Analitikai mérlegen bemértem 42 g Columbia agart melyet 1 l ioncserélt vízben elkevertem és 121 °C-on 15 percig sterilizáltam. A szuszpenziót 100 °C-ra hűtöttem és 0,3 nm-es szűrőn keresztül beleszűrtem 4g defibrinált birkavért és elkevertem. A 45 °C-ra lehűtött táptalajt steril Petri-csészébe öntöttem és vízszintes helyzetben hagytam megdermedni.
- **CHROMagar MRSAII** (BD, UK): Készen vásárolt szilárd táptalaj 90 mm-es Petri-csészében, melynek összetétele: 1 l ioncserélt víz, 35 g kromopepton, 0,5 g kromogén keverék, 17,5 g nátrium-klorid, 7,52 g gátló anyagok, 5,2 g cefoxitin, 14 g agar.

3.1.3. *A koaguláz-pozitív Staphylococcus fajok azonosítása*

A koaguláz-pozitív *Staphylococcus* fajokat az MSZ EN ISO 6888-1:2008 szabvány módszerei alapján határoztam meg. Baird-Parker (Biokar, Fr) szelektív táptalajra szélesztettem a törzseket, melyet 37 °C-on 48 órán át inkubáltam aerob körülmények között. Ezt követően a törzseket átoltottam Columbia véres agarra (Neogen, UK), melyet 24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltam, majd megvizsgáltam a törzsek hemolizin termelését.

Latex agglutinációs (PASTOREX™ STAPH-PLUS) gyorsvizsgát is végeztem a koaguláz-pozitív *Staphylococcus* törzseken, mely a fibrinogén aktivitás (clumping faktor), a protein A és a *Staphylococcus aureus* tok poliszacharidjainak egyidejű kimutatásán alapul.

3.1.4. *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* (MSHR1132^T=DSM 28299^T), 1db *S. schweitzeri* (FSA084^T=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 (6. táblázat).

6. táblázat: Haszonállatokból izolált *S. aureus* törzsek

Faj	Azonosító
szarvasmarha	SA-127
szarvasmarha	SA-146
ló	SA-297
sertés	SA-136
szarvasmarha	SA-237
sertés	SA-034
sertés	SA-113
sertés	SA-126
szarvasmarha	SA-116
szarvasmarha	SA-121
szarvasmarha	SA-145
ló	SA-329
sertés	SA-065

Élelmiszerekből izolált törzsek: A koaguláz-pozitív *Staphylococcus* törzsek gyűjtése 2018. 01. 23-tól 2018. 03. 05-ig tartott, melyet az MSZ EN ISO 6888-1:2008 szabvány módszerei alapján határoztam meg a WESSLING Hungary Kft. mikrobiológiai osztályán. A vizsgálat során összesen a 647 élelmiszer mintából, a 4/1998. (XI. 11.) EüM rendelet alapján meghatározott határértéket 58 koaguláz-pozitív *Staphylococcus* törzs haladta meg, amelyből a latex agglutinációs teszt és a MALDI Biotyper azonosítást követően, 47 izolátum *S. aureus* törzsnek bizonyult (7. táblázat).

7. táblázat: Élelmiszerekből izolált *S. aureus* törzsek

Élelmiszer kategória	Azonosító	Élelmiszer megnevezése
Tejtermék	SA-1	Trappista sajt
	SA-10	Trappista sajt
	SA-18	Tejes desszert
Szárasztészta	SA-2	Szárasztészta
	SA-49	Szárasztészta
	SA-7	Szárasztészta
	SA-21	Szárasztészta
	SA-22	Szárasztészta
	SA-11	Szárasztészta
	SA-12	Csirkecomb
Baromfi	SA-13	Csirkecomb
	SA-16	Pácolt csirke
	SA-44	Egész kacs
	SA-17	Libamáj
	SA-20	Kacsatál
	SA-28	Kacs comb
	SA-29	Kacs tepertő
	SA-4	Császárszalonna
	SA-31	Bacon
	SA-5	Kolbász
Hús	SA-6	Karaj
	SA-32	Karaj
	SA-25	Kolbász
	SA-33	Karaj
	SA-24	Lapocka
	SA-34	Karaj
	SA-9	Lapocka
	SA-35	Lapocka
	SA-36	Lapocka
	SA-37	Lapocka
	SA-15	Tepertő
	SA-38	Sütnivaló kolbász
	SA-02	Lapocka
	SA-01	Kolbász
	SA-39	Csülök
	SA-40	Csülök
	SA-41	Fej
	SA-47	Tarja
	SA-3	Marhahús
	SA-8	Marhahús
	SA-48	Belsőség
	SA-42	Nyúlhús
	SA-43	Hamburger hús
Készételek	SA-50	Grill csirke
	SA-45	Csokoládé
	SA-46	Friss saláta mix
Zöldségek	SA-27	Sárgarépa pástétom

3.1.5. MALDI-TOF MS vizsgálat

3.1.5.1. Eszközök, vegyszerek, oldatok

Eszközök:

- 1,5, 2,0 ml-es Eppendorf csövek,
- steril fogpiszkáló,
- 1 µl-es steril oltókacs,
- 10 ml-es csavaros tetejű kémcső,
- analitikai mérleg (0,01 mg pontosság),
- Eppendorf pipetták 50-1000 µl-es, 2-200 µl-es, 0,5-10 µl-es méreteken,
- vortex rázógép,
- asztali centrifuga Eppendorf csövekhez (min.13.000 rpm),
- rotator SB2,
- ultrahangos fürdő,
- MALDI mintatartó lemez,
- Bruker microflex LT MALDI-TOF készülék MALDI Biotyper RTC szoftverrel.

Vegyszerek:

- etanol abszolút (EtOH - vízmentes, analitikai tisztaságú) (Merck GmbH),
- acetonitril (ACN - HPLC gradient grade tisztaságú) (Sigma-Aldrich Kft.),
- metanol (MeOH - HPLC gradient grade tisztaságú) (Sigma-Aldrich Kft),
- 2-Propanol (iPA - HPLC tisztaságú) (HoneyWell GmbH),
- grafitpor (2 - 20 µm szemcseméretű) (Sigma-Aldrich Kft),
- alumínium-oxid por (MS tisztításhoz) (Sigma-Aldrich Kft),
- ionmentes víz (Milli Q víz) (Merck GmbH),
- trifluoecetsav (TFA, 100%-os, analitikai tisztaságú) (Merck GmbH),
- hangyasav (FA - 100%-os tisztaságú) (Merck GmbH),
- α-ciano-4-hidroxi-fahéjsav (α-HCCA - ultra tisztaságú, MALDI mátrix) (Bruker Daltonik, GmbH),
- szinapinsav (SA- ultra tisztaságú, MALDI mátrix) (Bruker Daltonik, GmbH),
- 2,5 dihidroxi benzoésav (DHB - ultra tisztaságú, MALDI mátrix) (Bruker Daltonik, GmbH),

- MALDI-TOF Kalibráló Standard (Bruker Bacterial Standard, Part.No.: 8255343), liofilizált *Escherichia coli* (Bruker Daltonik, GmbH).

Munkaoldatok, kalibrációs oldatok:

- **70%-os (v/v %) hangyasav oldat:** Az ionmentes vízből pipettával bemértem 300 µl-t egy 1,5ml-es Eppendorf csőbe és hozzámértem 700 µl 100%-os hangyasavat, majd alaposan összeráztam. Az így készített oldatot szobahőmérsékleten legfeljebb 1 hónapig tároltam.
- **80%-os (v/v %) trifluorecetsav oldat:** Az ionmentes vízből pipettával bemértem 200 µl-t egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe és hozzámértem 800 µl 100%-os trifluorecetsavat, majd alaposan összeráztam. Az így készített oldatot szobahőmérsékleten legfeljebb 1 hónapig tároltam.
- **Mátrix standard oldat:** Az ionmentes vízből pipettával bemértem 450 µl-t egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe és hozzámértem 500 µl acetonitrilt és 25 µl 100%-os trifluorecetsavat, majd alaposan összeráztam. Az így készített oldatot szobahőmérsékleten legfeljebb 1 hónapig tároltam.
- **α-HCCA (α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid) mátrix oldat:** (1 mg / 100 µl): egy 2,5 ml-es csavaros tetejű fiolába analitikai mérlegen bemértem 2,5 mg α-HCCA mátrixot és pipettával hozzámértem 250 µl standard oldatot. Vortex-el alaposan megkevertem és ultrahangos fürdőbe raktam 3 percre. Hűtőben 4 °C-on legfeljebb 1 hétig tároltam. Az α-HCCA mátrix a 0,7-20 kDa tömegű, kisebb fehérjék detektálását teszi lehetővé (Bruker Daltonik GmbH, 2013d).
- **SA (Sinapinic acid) mátrix oldat:** (2,5 mg / 100 µl): egy 2,5 ml-es csavaros tetejű fiolába analitikai mérlegen bemértem 5 mg SA mátrixot és pipettával hozzámértem 250 µl standard oldatot, majd vortex-el alaposan megkevertem. Hűtőben 4 °C-on legfeljebb 1 hétig tároltam. Az SA mátrix a nagyobb tömegű fehérjék (10–150 kDa) detektálását teszi lehetővé (Bruker Daltonik GmbH, 2013c).
- **2,5-DHB (2,5-Dihydroxybenzoic acid) mátrix oldat:** (2mg / 100 µl): egy 2,5 ml-es csavaros tetejű fiolába analitikai mérlegen bemértem 2 mg 2,5-DHB mátrixot és pipettával hozzámértem 200 µl standard oldatot, majd vortex-el alaposan megkevertem. Hűtőben 4 °C-on legfeljebb 1 hétig tároltam. A 2,5-DHB mátrix széles körűen alkalmazható a különböző peptidek, fehérjék,

polimerek és szénhidrátok – beleértve a foszfolipidek és glikoproteinek elemzésére (Bruker Daltonik GmbH, 2013e).

- **MALDI kalibráló standard oldat:** az eredeti csavaros tetejű fiolába, a liofilizált standardhoz pipettával bemértem 50 µl standard oldatot, majd alaposan megkevertem. -20 °C-on legfeljebb 4 hétig tároltam.

3.1.5.2. Alkalmazott minta-előkészítési eljárások

- **Etanolos extrakció (EtOH-FA):** 300 µl ioncserélt vizet pipettáztam egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe. A vizsgálandó tenyészetből, steril oltókaccsal kivettem néhány tized milligramm mintát és intenzív keveréssel az ioncserélt vízben elszuszpendáltam. Ezután hozzámértem 900 µl abszolút etanolt. Vortexen megkevertem, majd lecentrifugáltam (13000 rpm, 3 perc). A felülúszót óvatos mozdulattal leöntöttem és hagytam az oldószer maradékot elpárologni. A mintához hozzámértem 20 µl 70%-os hangyasavat, a pipetta hegyével elkevertem 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, következő pozíciójára 1 µl-t cseppentettem fel. Minden esetben 6 párhuzamos mintafelvitelt alkalmaztam, azaz a mintatartó lemez 6 egymás alatti/melletti pozíciójára ugyanazt a mintát vittem fel. Az oldószer elpárolgása után közvetlenül 1 µl mátrix oldatot cseppentettem a mintára és lamináris boksban hagytam beszáradni a mintát (Bruker Daltonik GmbH, 2013a).
- **Direkt mintafelvitel hangyasavval (DT-FA):** A vizsgálandó tenyészetből egy steril kaccsal vettem néhány tized milligramm biológiai mintát. Ezt közvetlenül az előkészített mintatartó lemez egyik pozíciójára kentem fel, lehetőség szerint minél egyenletesebben. Ebben az esetben is 6 párhuzamos mintafelvitelt alkalmaztam. A felkent mintákra 1 µl 70%-os hangyasavat cseppentettem és lamináris boksban hagytam beszáradni. Ezután 1 µl mátrix oldatot pipettáztam a mintákra (Bruker Daltonik GmbH, 2013a).
- **Direkt mintafelvitel (DT):** A vizsgálandó tenyészetből egy steril kaccsal vettem néhány tized milligramm biológiai mintát. Ezt közvetlenül az előkészített mintatartó lemez egyik pozíciójára kentem fel lehetőség szerint minél

egyenletesebben. Ebben az esetben is 6 párhuzamos mintafelvitelt alkalmaztam. 1 µl mátrix oldatot cseppentettem a mintára és lamináris boksztan hagytam elpárologni az oldószert, beszáradni a mintát (Bruker Daltonik GmbH, 2013b).

3.1.5.3. Mintatartó lemez előkészítése

A szennyezett mintatartó lemezeket 70%-os etanolba áztattam 5-10 percen keresztül. Áztatást követően meleg folyóvízzel lemostam a mátrix és a mikroorganizmus telepek maradékát, majd alumínium-oxid vizes szuszpenziójával átdörzsöltem a lemezeket és papírtörlő segítségével leittattam róla a vizet. 5 - 10 percig metanolban áztattam a lemezeket, majd lamináris boksztan hagytam elpárologni a metanol maradékát, ezt követően a lemezeket 2-propanolba mártott szálmentes törlőkendővel dörzsöltem át. Lamináris boksztan a lemezek közepére 50 µl 80%-os trifluorecetsav oldatot pipettáztam és steril fültisztító pálcika segítségével a lemezeket alaposan átdörzsöltem, majd a trifluorecetsav maradékát ionmentes vízzel lemostam. A megszáritott lemezeket kevés grafitporral átdörzsöltem, a grafitpor maradékát finom ecsettel eltávolítottam. Az előkészített mintatartó lemezeket Petri csészében tároltam a vizsgálatok megkezdéséig (Bruker Daltonik GmbH, 2015).

3.1.5.4. MALDI-TOF MS mérés

A vizsgálati paraméterek beállítását, a módszer fájlok aktiválását, a kalibrációt a **FlexControl** szoftver (Bruker Daltonik GmbH) segítségével végeztem el. A mintatartó lemezt a zsiliprendszeren keresztül juttattam az ionforrásba. Ellenőriztem a vákuumot, majd a kalibráló standard oldatot tartalmazó pozícióra (A2) állítottam a lézert és az 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. Az ionforrás feszültségét 15-28 kV-ra állítottam. A MALDI-TOF MS vizsgálatok során minden izolátum esetében 6 ismétlésben végeztem el a mérést.

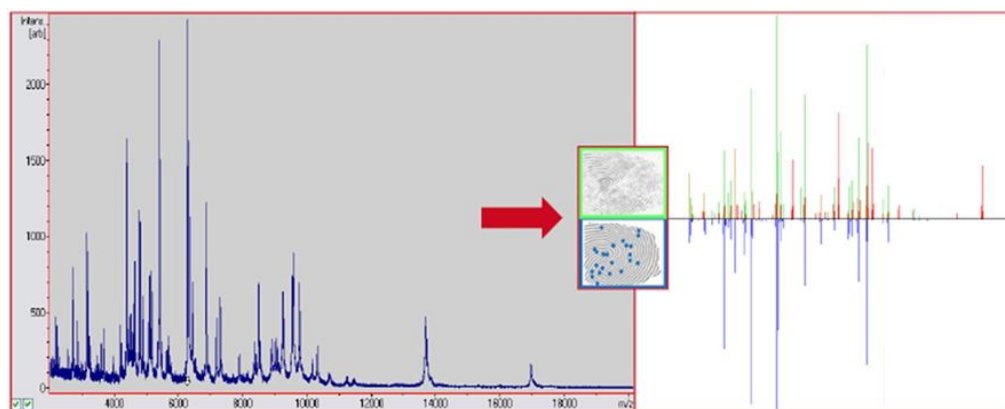
3.1.5.5. Spektrumok értékelése

3.1.5.5.1. *S. aureus* törzsek azonosítása

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 (5. ábra). Az eljárás során más tömegspektrometriás szoftverekhez hasonlóan, a spektrumkönyvtári összehasonlítás során, egy *log score* értéket kapunk. Ez egy 0,000 és 3,000 közötti érték, mely az azonosítás minőségére vonatkozó számszerűsített információ, melyet a szoftver az alábbiak szerint számít ki:

1. A könyvtárban található referencia spektrumokhoz hasonlítja az azonosítani kívánt minta tömegspektrumát, a referencia spektrumban detektálható fragment ion csúcsok alapján;
2. A minta tömegspektrumát tekinti alapnak, tehát ehhez hasonlítja a könyvtárban található referencia tömegspektrumokat;
3. A minta tömegspektrumának és a referencia tömegspektrumoknak a szimmetria viszonyait hasonlítja össze.

A szoftver mind a három elemzési lépés során kiszámít egy-egy megfelelőségi faktort (*score*), amely egy 0,000 és 1,000 közötti érték. Az elemzési lépésekből származó értékeket összeszorozza és 1000-re normalizálja, melynek a logaritmusát adja az azonosítási *log score* értéket.



5. ábra A MALDI BioTyper 2.0 szoftverrel történő azonosítás (Forrás: SIMON, 2016)

Amennyiben a *log score* érték nagyobb 2,300-nél, akkor igen valószínű az azonosság a vizsgált mikroorganizmus és a referencia spektrumkönyvtárban található mikroorganizmus között. Ebben az esetben azonosítottnak tekintjük a fajt, így további vizsgálat nem szükséges. 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. Az azonosítás során a tíz legjobb *log score* értékkel rendelkező találatot tudjuk megjeleníteni (LOVÁSZ, 2014).

A szoftver könyvtárában 4 különféle *S. aureus* (ATCC 33862, ATCC 33591, ATCC 29213 és ATCC 25923), 9 db *S. aureus* ssp. *aureus* (DSM 799, DSM 4910, DSM 3463, DSM 346, DSM 20652, DSM 20491, DSM 20232, DSM 20231T, DSM 11822) és 1 db *S. aureus* ssp. *anaerobius* (DSM 207) referencia törzs tömegspektruma volt megtalálható.

3.1.5.5.2. A spektrumok részletes elemzése, kalibrálása

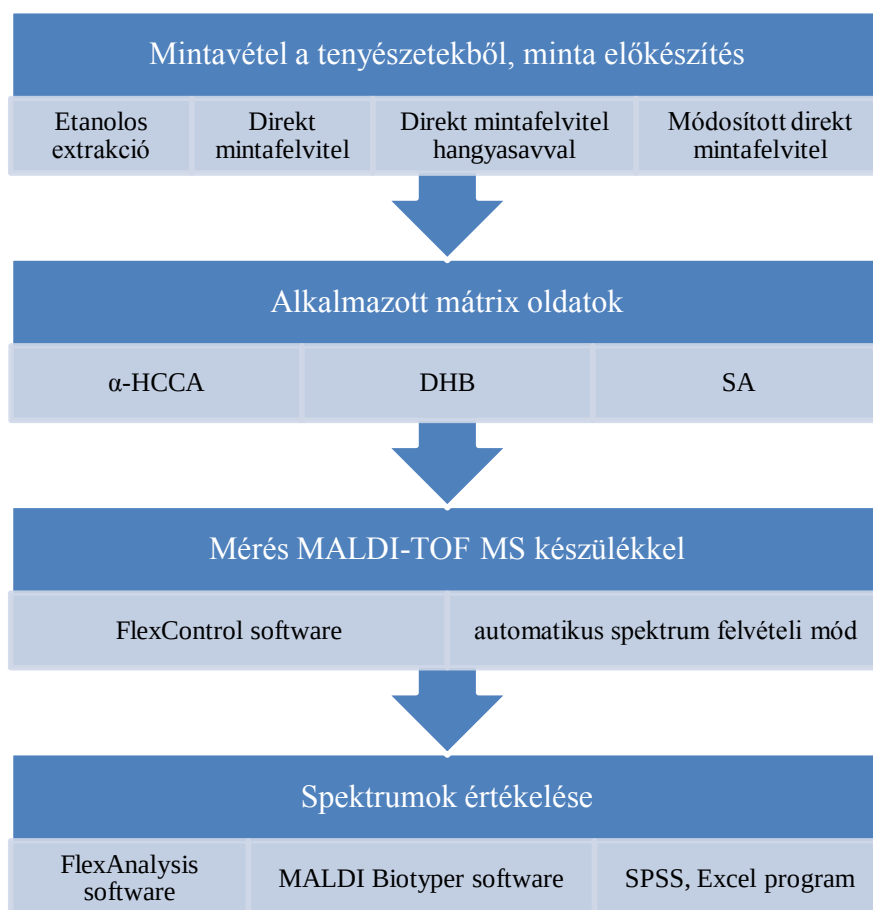
A spektrumok vizsgálatához a **FlexAnalysis 3.4** szoftvert (Bruker Daltonik, GmbH) alkalmaztam, amely lehetővé teszi a felvett spektrumok kalibrálását valamint részletes elemzését. Módszerfájlok aktiválásával el tudtam végezni a fragment ion csúcsok simítását és alapvonal korrekcióját, valamint elemezni tudtam a csúcsokhoz tartozó tömeg/töltés értékeket (m/z) és azok intenzitását, relatív intenzitását, jel/zaj arány értékét, görbe alatti területét. A jel/zaj arány meghatározása a csúcs magasság és háromszor a zaj szórásának hányadosa alapján számítható ki, melynek célja a nem valódi csúcsok (zaj) kiszűrése. Az alapvonalhoz viszonyított legmagasabb fragment ion csúcs a relatív intenzitás, mely egy százalékos érték. Továbbá információt kapunk a minta tömegspektrumában található csúcsok számáról és a teljes spektrum intenzitásáról. A vizsgálat során a simítást a Savitzky–Golay szűrővel, az alapvonal korrekcióját pedig a TopHat algoritmussal végeztem el. A spektrumok nagyítása és a 3 rendezési opció (egymáson, egymás mögött eltolva, listaszerű elrendezés) megkönnyítette a részletes elemzést.

A vizsgálatok során először a 4 féle minta-előkészítési módszert, 4 féle táptalajt és a tenyésztési időt valamint a 3 féle mátrix oldatot hasonlítottam össze a kapott

spektrumok felbontása, intenzitása, reprodukálhatósága és az azonosítási log score értékek alapján (6. ábra).

Egyéni fragment ion csúcsok megadásával a szoftver lehetővé teszi a spektrumok kalibrálását, mely elengedhetetlen a pontosabb m/z értékek, ezáltal a minták tömegspektrumainak elemzése és összehasonlítása során. A kalibrációhoz szükséges csúcsok meghatározása során több kritériumot is figyelembe kellett vennem:

1. Az adott fragment ion csúcs minden vizsgált *S. aureus* fajban detektálható legyen, függetlenül az *spa* és MLST típustól, valamint a rezisztencia jelenlététől;
2. Az adott fragment ion csúcs detektálható legyen minden minta-előkészítési eljárás és mátrix oldat alkalmazásával;
3. A fragment ion csúcsok, m/z értéküket tekintve fedjék le a spektrum egészét.



6. ábra MALDI-TOF MS vizsgálat folyamata

3.1.5.5.3. A spektrumok elemzése Excel programban

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. Első lépésben szuperspektrumokat hoztam létre, melyek az izolátumok 6 párhuzamos mérési eredményeinek átlagát jelentették, ezáltal megkönnyítve a törzsek összehasonlítását és elemzését. Az azonosítás és/vagy elkülönítés szempontjából jelentős fragment ion csúcsok esetében kiszámítottam a relatív intenzitás átlagát és szórását valamint figyelembe vettem a jel/zaj arány átlagát is, a nem valódi csúcsok kiszűrése érdekében.

A spektrumok reprodukálhatóságának vizsgálata, a minta-előkészítési eljárások optimalizálása és a mátrix oldatok kiválasztása során, a spektrumokat nem csak vizuálisan, hanem számszerűsített adatokkal is elemeztem, mely magába foglalta a teljes spektrum intenzitását, a spektrumot alkotó csúcsok számát és a mérhető tömegszám tartományt (legkisebb és legnagyobb detektálható m/z érték).

Továbbá a „számszerűsített” szuperspektrumok megkönnyítették a methicillin-rezisztencia és a különböző szekvencia típusok specifikus tömegszámainak, valamint marker szettjeinek meghatározását.

3.1.5.5.4. Spektrumok elemzése SPSS 16.0 program segítségével

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.

3.1.6. *S. aureus* törzsek methicillin-rezisztenciájának meghatározása

3.1.6.1. Korongdiffúziós módszer

A CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) által meghatározott előírásoknak (2019) megfelelően vizsgáltam a törzsek antibiotikum-rezisztenciáját. A baktérium-szuszpenziót (0,5 McFarland egység) Mueller-Hinton agar felületén

szélesztettem egy steril kacs segítségével, majd a Cefoxitin 30 µg korongokat a táptalaj felületére helyeztem. A törzseket 18 órán át inkubáltam 37 °C-on. Az előírások alapján, MRSA törzsek esetében a feltisztulási zóna 6-19 mm, míg *mecA* negatív fajoknál 20-32 mm.

3.1.6.2. MRSA CHROMagar táptalaj alkalmazása

A CHROMagar MRSaII egy szelektív differenciáló táptalaj, mely a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* fajok kimutatására szolgál. A tápközegben specifikus kromogén anyagok és cefoxitin található, ezáltal lehetővé téve az MRSA közvetlen azonosítását. A methicillin-rezisztens törzsek képesek szaporodni cefoxitin jelenlétében, így mályvaszínű telepek nőnek a táptalajon, a kromogén szubsztrát hidrolízise eredményeként. A táptalaj további szelektáló anyagokat tartalmaz, melyek meggátolják az élesztőgombák, a gram-negatív mikroorganizmusok és néhány egyéb Gram-pozitív coccus növekedését. A nem MRSA baktériumok, a tápközeg egyéb kromogén szubsztrátjait használják fel, így a kinőtt telepek nem mályvaszínűek, hanem kék vagy kékeszöld színűek. Abban az esetben, ha a telepek fehérek vagy színtelenek az adott baktérium nem használt fel kromogént. A vizsgálat során az izolátumokat 24 h keresztül inkubáltam aerob körülmények között 37 °C-on. A lemezeket fekete háttér előtt elemeztem, MRSA baktériumnak azokat a törzseket tekintettem, melyek mályvaszínű és morfológiailag *Staphylococcus*okhoz hasonló telepeket képeztek.

3.1.6.3. A *mecA* génkomplex vizsgálata

A vizsgálat menete

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. A PCR eredményességét agaróz gél-elektroforézissel ellenőriztem, majd a sikeresen felszaporított génszakaszok PCR termékét, oszlopos vákuum-rendszerrel tisztítottam.

DNS izolálás

1. A baktérium szuszpenzióból 1 ml-t egy steril 1,5 ml-es csőbe pipettáztam, majd centrifugáltam (13400 rpm, 3 perc).

2. Eltávolítottam a felülúszót.
3. 100 µl PrepMan Ultra Sample Preparation reagenst adtam a lecentrifugált mintákhoz. A szilárd táptalajon lévő mintákból a mikrobatelepet steril oltókacs segítségével 100 µl PrepMan Ultra Sample Preparation reagenst tartalmazó csőbe mértem.
4. Homogenizáltam a mintát vortex-el 10-30 másodpercig.
5. Ezután hőkezelést végeztem 100 °C-on 10 percig.
6. Vortex segítségével újra homogenizáltam az elegyeket.
7. Centrifugáltam a mintákat (13400 rpm, 3 perc).hh
8. A felülúszóból 10 µl DNS extraktumot pipettáztam egy steril 1,5 ml-es csőbe, majd hozzáadtam 90 µl steril vizet.

PCR reakciók a *mecA* génszakaszra

A mérés során alkalmazott PCR készülékek:

- ABI GeneAmp PCR System 2600, Biosystems Veriti™ típusú készülék.

Az izolált DNS mintára *mecA* PCR reakciót mértem össze és minden esetben használtam egy negatív kontroll mintát, amely nem tartalmazott templát DNS-t (NTC), és egy pozitív kontroll mintát is, (DSM 20231 és /vagy ATCC 43300) *Staphylococcus aureus* törzsből izolált DNS templát. Az adott primerpárral kapott *mecA* génszakasz mérete 527 bp hosszú (8. táblázat).

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

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

A PCR reakciókat 25 µl végtérfogatban mértem össze az 9. táblázat alapján, a 10. táblázatban megjelölt PCR hőprofilal.

9. táblázat: A *mecA* génszakasz felszaporításához használt PCR-összetétel

Bemért anyag	mennyiség/reakció
Sigma Jumpstart REDTaq_ReadyMix	12,5 µl
<i>mecA</i> _fwd primer (10µM)	1,5 µl
<i>mecA</i> _rev primer (10µM)	1,5 µl
Víz (mol. biol. grade)	7,5 µl
DNS templát (10x)	2 µl

10. táblázat: A *mecA* génszakasz felszaporításához alkalmazott hőprofil

Folyamat	Hőfok és idő
Denaturáció	94 °C-on 3 perc
Ciklus	94 °C-on 30 sec } 60 °C-on 30 sec } 30 ciklus 72 °C-on 1 perc }
Extenzió	72 °C-on 10 perc
Tárolás	4 °C-on

Agaróz gél-elektroforézissel (1%) győződtem meg arról, hogy minden DNS minta és minden gén esetében egy specifikus terméket kaptam a várt termék hosszúságnak megfelelően.

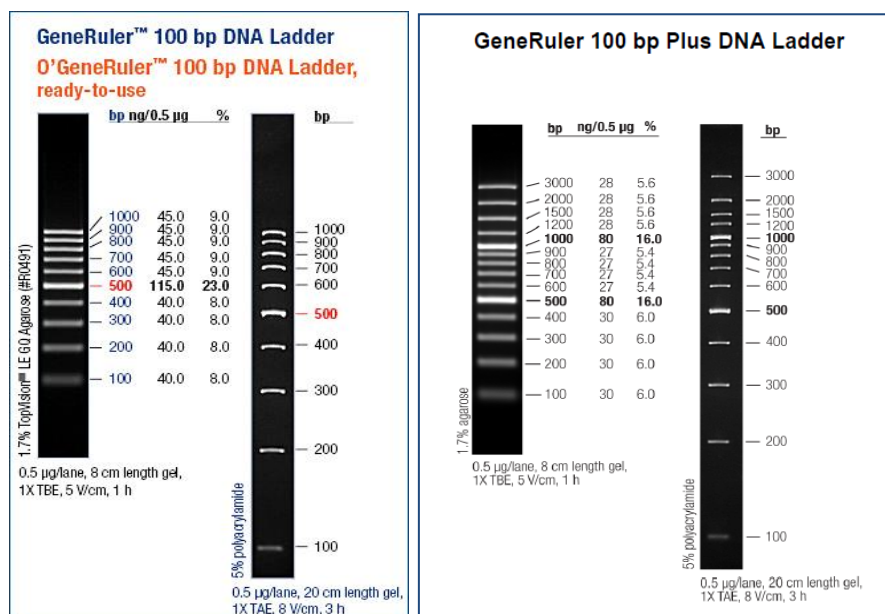
Gélelektroforézis- A PCR termékek minőségének ellenőrzése

Az agaróz-gél elkészítésének lépései:

1. Összeállítottam a gélöntő tálcát, és beleillesztettem a műanyag fésűt az öntőmintába.
2. Erlenmeyer lombikba 0,6 g agarózt, és 60 ml 1xTBE puffer oldatot mértem be. Az oldatot mikrohullámú sütőben felmelegítettük gyakori kevergetés mellett, míg az agaróz teljesen felolvadt. Ezután az oldathoz 6 µl fluoreszcens festéket

(GelGreen) adtam, homogenizáltam, majd az agaróz oldatot az előkészített géllöntő tálcába öntöttem.

3. A gél 30-40 perc alatt megszilárdult és a „fésű” eltávolíthatóvá vált.
4. Feltöltöttem az elektroforézis tankot 1xTBE pufferrel, beletettem a gél a géllöntő tálcával együtt, úgy hogy a minta felvitelére szolgáló zsebek a katód (-) felé helyezkedjenek el, majd a tartályba öntöttem még annyi puffert, hogy a gél 1-2 mm magasan ellepje.
5. Az elválasztani kívánt PCR termékekből 5 µl-t 3 µl 6x Loading Dye festékkel összekevertem és pipettával a „gélzsebekbe” töltöttem. A minták után 2 µl molekulasúly markert vittünk fel (7. ábra).



7. ábra Az alkalmazandó 100 bp-os és a 100 bp Plus DNS molekulamarkerek

6. A puffertartályra ráhelyeztem a tetejét, és csatlakoztattam az elektromos vezetékekkel a tápegység kimeneteihez, bekapcsoltam a tápegységet, és beállítottam 100 V-ra a feszültséget. Addig futtattam a gél, amíg a futási frontot jelző festék a gél kb. két-harmadáig el nem ért.
7. A tápegység kikapcsolása után kivettem a gél a tálcával együtt, majd kék fény megvilágítás alatt ellenőriztem a keletkezett fragmentumokat.

PCR termék tisztítása oszloppal, vákuum rendszerrel

A PCR termékek oszlopos tisztítását 8 db-os strip-es (NucleoSpin ® 8 PCR Clean-up kit), illetve 96 db-os, plate-es (NucleoSpin ® 96 PCR Clean-up kit) kiserelésben végeztem. A minták mellett egy pozitív mintát (ATCC 29213) is megtisztítottam.

A vákuum rendszer összeszerelése, az oldatok előkészítése:

- NT3 Wash Buffer előkészítése: a 100 ml törzsoldathoz hozzámértem 400 ml 96% etanolt.

NucleoSpin 8-as vagy 96-os PCR Clean-up:

- A NucleoSpin 8-as, strip-es kiserelésben a mintaszámnak megfelelő számú tisztító strip-et (8 db minta/1 db strip) behelyeztem a fém strip keretbe. Az üres helyekre „vak” strip-eket (*dummy strips*) tettem, hogy a vákuum kialakítható legyen.
- A NucleoSpin 96-os plate-es kiserelésben a tisztító plate-et (96 db minta/1 db plate) behelyeztem a fém strip keretbe.
- A fém strip keretet a behelyezett oszlopokkal rátettem a műanyag tetőre.
- A vákuumrendszer alapjába behelyeztem a távtartót és a hulladék gyűjtőt, majd ráhelyeztem a plate elvezetőt, végül a műanyag tetőt.

A tisztítás menete:

1. A PCR termékek mennyiségét NE puffer hozzáadásával egészítettem ki 100 µl-re.
2. A tisztító oszlopokra mértem rá egyenként 200 µl NT puffert, majd a PCR mintákat a tisztító oszlopokra mértem és összekevertem az előzőleg oszlopokra mért NT pufferrel.
3. A vákuum csapot kinyitottam, ezzel vákuumrendszerben vákuum alakult ki, a minta átáramlott az oszlopon és rákötött a szilika membránra. 1 perc után elzártam a vákuum csapot.
4. Átmostam a szilika membránokat 900 µl NT3 pufferrel. A vákuum csapot kinyitottam 1 percre és ezt a folyamatot megismételtem.
5. A maradék NT3 puffer eltávolítása előtt kivettem a vákuumrendszer alapból a hulladékgyűjtőt, plate elvezetőt és a távtartót, majd az alapra vissza helyeztem a műanyag tetőt a tisztító oszlopokkal.

6. Kinyitottam teljesen a vákuum csapot és szárítottam az oszlopokat 15-20 percig.
7. Az eluáláshoz behelyeztem az alapba a távtartót, erre ráhelyeztem az eluáló tömböt, melybe belehelyeztem a tiszta platet vagy strip-eket. Visszatettem a műanyag tetőt a tisztító oszlopokkal.
8. 80-100 µl NE puffert mértem az oszlopokra, ügyelve arra, hogy az eluáló puffer a membrán közepére kerüljön. Az oszlopokat 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltam, majd kinyitottam teljesen a vákuum csapot. 5 perc múlva elzártam és az eluenseket tartalmazó plate-et vagy strip-eket gondosan lezártam.
9. Az eluált DNS oldatot -20 °C-on tároltam.

3.1.7. Szekvencia alapú tipizálási módszerek

3.1.7.1. *spa* tipizálás

A vizsgálat menete

A baktériumból genomi DNS-t izoláltam, majd PCR segítségével felszaporítottam a *Staphylococcus aureus* protein A génszakaszt (*spa*). A PCR eredményességét agaróz gél-elektroforézissel ellenőriztem, majd a sikeresen felszaporított génszakaszok PCR termékét oszlopos vákuum-rendszerrel tisztítottam (3.1.6.3. fejezetben leírtak alapján). Meghatároztam a megtisztított PCR termékek nukleotid sorrendjét és a szekvencia adatokat a *BioNumerics* szoftver segítségével értékeltem. A Nemzeti Élelmiszertudományi Intézet (National Food Institute – NFI) 2012-ben kiadott protokollja alapján végeztem az eljárást.

PCR reakciók a *Staphylococcus aureus* protein A (*spa*) génszakaszra

A mérés során alkalmazott PCR készülékek:

- ABI GeneAmp PCR System 2600, Biosystems Veriti™ típusú készülék.

Az izolált DNS mintára *spa* PCR reakciót mértem össze, és minden esetben használtam egy templát DNS-t nem tartalmazó negatív kontroll mintát (NTC), és egy pozitív kontroll mintát is (DSM 20231 és /vagy ATCC 43300) *Staphylococcus aureus* törzsből izolált DNS templátot. Az adott primerpárral kapott *spa* génszakasz mérete az ismétlések hosszától és az ismétlések számától függ, 200-600 bp-nyi tartományba esik.

A *Staphylococcus aureus* protein A génszakasz felszaporításához a 11. táblázatban látható primerpárt használtam.

11. 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 PCR reakciókat 25 µl végtérfigatban mértem össze a 12. táblázat alapján és a 13. táblázatban megjelölt PCR hőprofilal.

12. táblázat: A *Staphylococcus aureus* protein A génszakasz felszaporításához használt

PCR-összetétel

Bemért anyag	menyiség/reakció
Sigma Jumpstart REDTaq_ReadyMix	12,5 µl
spa-1113F primer (10µM)	1,5 µl
spa-1514R primer (10µM)	1,5 µl
Víz (mol. biol. grade)	7,5 µl
DNS templát (10x)	2 µl

13. táblázat: A *Staphylococcus aureus* protein A génszakasz felszaporításához

alkalmazott hőprofil

Folyamat	Hőfok és idő
Denaturáció	94 °C-on 3 perc
Ciklus	94 °C-on 30 sec } 60 °C-on 30 sec } 30 ciklus 72 °C-on 1 perc }
Extenzió	72 °C-on 10 perc
Tárolás	4 °C-on

Nukleotid sorrend meghatározás

A nukleotid sorrend meghatározását mindkét irányból, azaz a forward és a reverz primerrel külön-külön is elvégeztem. A szekvenálás során a jelölő PCR-hez ugyanazokat a primereket használtam, mint amelyeket korábban a *Staphylococcus aureus spa* PCR amplifikáláshoz is használtam (11. táblázat).

A szekvencia eredmények értékelése és az *spa* típusok azonosítása BioNumerics 7.6 szoftver segítségével

Az ABI 3130xL Genetikai analizátorral kiértékelt nyers kromatogram file-okat importáltam BioNumerics 7.6 szoftverbe. Az importálásnál meghatároztam az importálási templátokat, amelyben rögzíthető, hogy a szekvencia file nevéből milyen információt rögzítsen a szoftver a fő menü adatbázisában. Alapesetben a „*spa-typing*” importálási templátot választottam ki, ami a szekvencia file nevéből a minta azonosítóját definiálta. A szoftver elvégezte a szekvencia végek levágását és egyes mintákhoz tartozó forward és reverz irányú szekvenciák összeillesztését. Elvégeztem a szekvencia illesztések ellenőrzését, mely során minden minta/sekvencia típushoz tartozik egy, az adott összerakott szekvencia illesztésének minőségét jelző megjegyzés.

Az összeillesztett szekvenciákban a program ismert ismétlődő (*repeat*) szakaszokat keres. Az ismétlődések alapján beazonosítható *spa* típusok az adatbázis „SpaType” oszlopában jelentek meg, illetve a nem beazonosítható típusokat is jelzi a szoftver:

- Amennyiben teljesen azonosítható volt az adott ismétlődés a szekvenciában, akkor az oszlopban az *spa* típus száma szerepelt (pl. t001).
- Amennyiben nem volt teljes az ismétlődések sorozata, akkor az oszlopban ”???” szerepelt.
- Amennyiben eddig még nem azonosított ismétlődés kombinációt azonosított, akkor az oszlopban ”Unknown” felirat szerepelt.
- Amennyiben semmilyen ismétlődés (*repeat*) nem található a szekvenciában, akkor az oszlopban ”NA” szerepel.

A szoftver lehetővé tette, hogy a kapott *spa* típusok alapján a minták között összehasonlítást vegezzek. Hasonlósági dendrogramot és hasonlósági mátrixot tudtam előállítani a törzsek *spa* szekvencia különbözőségének ábrázolására. Az adatmátrix teljesen vagy részben exportálható, illetve a szekvenciák, az ismétlődések és hasonlósági mátrixok is letölthetők a BioNumerics szoftverből.

3.1.7.2. MLST vizsgálat

A vizsgálat menete

A baktériumból genomi DNS-t izoláltam, majd felszaporítottam a 7 db *Staphylococcus aureus* fajra specifikus génszakaszt PCR segítségével. A PCR eredményességét agaróz gél-elektroforézissel ellenőriztem és a sikeresen felszaporított génszakaszok PCR termékét oszlopos vákuum-rendszerrel tisztítottam (3.6.1.3. fejezetben leírtak alapján). A megtisztított PCR termékek nukleotid sorrendjét meghatároztam és a szekvencia adatok értékelése a *BioNumerics* szoftver segítségével történt. Az eljárás THOMAS és mtsai, (2007) tanulmánya alapján került kidolgozásra.

PCR reakciók a *Staphylococcus aureus* fajra specifikus génszakaszokra

A méréshez használt PCR készülékek:

- ABI GeneAmp PCR System 2600, Biosystems Veriti™ típusú készülék.

A *Staphylococcus aureus* törzsek MLST vizsgálatára a PubMLST honlapon (<https://pubmlst.org/saureus/>) elérhető adatbázisban szereplő adatokat használtam. A *Staphylococcus aureus* törzsekre kifejlesztett 7 db háztartási gént és a gének felszaporításához használt primerek szekvenciáit a 14. táblázat tartalmazza.

14. 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

Minden izolált DNS minta esetében a 7 génre 7 db külön PCR reakciót mértem össze (15. táblázat és 16. táblázat) és minden gén esetében elvégeztem a vizsgálatot egy negatív kontroll mintán, amely nem tartalmazott DNS templátot (NTC), és egy pozitív kontroll (DSM 20231 és /vagy ATCC 43300 *Staphylococcus aureus* törzsből izolált DNS templát) mintán is.

15. táblázat: A *Staphylococcus aureus* fajra specifikus 7 db gén felszaporításához használt PCR-összetétel

Bemért anyag	mennyiség/reakció
Sigma Jumpstart REDTaq_ReadyMix	12,5 µl
Forward primer (10µM)	1,5 µl
Reverz primer (10µM)	1,5 µl
Víz (ultratisztaságú)	7,5 µl
DNS templát (10x)	2 µl

16. táblázat: A *Staphylococcus aureus* fajra specifikus 7 db gén felszaporításához alkalmazott hőprofil

Folyamat	Hőfok és idő
Denaturáció	95 °C-on 3 perc
Ciklus	95 °C-on 30 sec } 30 ciklus 50 °C-on 1 perc } 72 °C-on 1 perc }
Extenzió	72 °C-on 10 perc
Tárolás	4 °C-on

Agaróz gél-elektroforézissel győződtem meg arról, hogy minden DNS minta és minden gén esetében egy specifikus terméket kaptam a várt termék hosszúságnak megfelelően.

Nukleotid sorrend meghatározás

A nukleotid sorrend meghatározását mindkét irányból, azaz a forward és a reverz primerekkel, a PCR protokollnál leírt primerszettekkel külön-külön is elvégeztem, így minden *Staphylococcus aureus* törzs esetén 14 db szekvenáló reakciót mértem össze. A

szekvenálás során a jelölő PCR-hez ugyanazokat a primereket használtam, mint amelyeket korábban a 12. táblázatában a *Staphylococcus aureus*-specifikus PCR amplifikáláshoz is használtam.

A szekvencia eredmények értékelése és az MLST szekvencia típusok meghatározása BioNumerics 7.6 szoftver segítségével

A ABI 3130xL Genetikai analizátorral kiértékelt nyers kromatogram file-okat importáltam a *BioNumerics* 7.6 szoftverbe. A szoftver jelezte, hogy talált-e szekvencia illesztési problémákat a forward és reverz irányok illesztésekor. A helyesen illesztett génsekvenciákban a szoftver azonosította a PubMLST adatbázisban meghatározott gén szakaszhatárokat és az adott mintához hozzárendelte a szekvencia típust és allél verziószámokat. A kapott szekvencia típust és allél számokat táblázat formájában exportáltam a *BioNumerics* szoftverből. Az elemzéssel létrehozott MLST kompozit adatmátrix alapján a különböző mintákat egymással össze tudtam hasonlítani. Hasonlósági dendrogramot és hasonlósági mátrixot tudtam előállítani a különböző törzsek és génjeik nukleotid sorrend különbözőségének ábrázolására. A kompozit adatmátrix, teljesen vagy részben exportálható, illetve az adatmátrix és a dendrogram is letölthető a *BioNumerics* 7.6 szoftverből.

3.1.8. Enterotoxinokat kódoló gének vizsgálata

A vizsgálat menete

A törzsekből a genomiális DNS-t PrepMan Ultra lysis pufferrel (Thermo Scientific, Biocenter Ltd., Szeged, Magyarország) nyertem ki. A felülúszót TE-pufferrel ötszörösre hígítottam és ezt használtam a PCR amplifikációhoz. Az SE gének detektálására multiplex PCR protokollokat hajtottam végre az Európai Unió Koaguláz-Pozitív *Staphylococcusok* Referencialaboratóriumának (EU-RL CPS) primerkészleteivel (15., 16. és 17. táblázat). A *seh* és a *ser* géneket detektáló primereket harmadik, különálló reakcióként futtattam, hogy elkerüljem a hasonló méretű PCR termékek átfedését a gélelektroforézis során. A *S. aureus* DSMZ 18586 (SEB), DSMZ 18587 (SEC, SEG, SEH, SEI), DSMZ 18588 (SED, SEG, SEJ, SEJ, SER), DSMZ 18589 (SEE) és pozitív kontrollként ATCC 29213-at (SEA) referencia törzseket használtam. Az amplikonokat agaróz gélelektroforézissel választottam el, és becsült méretük alapján azonosítottam az egyes gének jelenlétét vagy hiányát.

DNS izolálás

1. A baktérium szuszpenzióból 1 ml-t egy steril 1,5 mL-es csőbe pipettáztam, majd centrifugáltam(13400 rpm, 3 perc).
2. Eltávolítottam a felülúszót.
3. 100 µl PrepMan Ultra lysis reagenst adtam a lecentrifugált mintákhoz.
4. Homogenizáltam a mintát vortex-el 10-30 másodpercig.
5. Ezután hőkezelést végeztem 100 °C-on 10 percig.
6. Vortex segítségével újra homogenizáltam az elegyeket.
7. 3 percig 13400 rpm centrifugáltam a mintákat.
8. A felülúszóból 10 µl DNS extraktumot pipettáztam egy steril 1,5 mL-es csőbe, majd hozzáadtam 90 µl steril vizet.

PCR reakciók az SE génszakaszokra

A méréshez során alkalmazott PCR készülék:

- GeneAmp System 9700

Az SE génszakaszok felszaporításához a 17-19. táblázatokban látható primerpárokat használtam.

17. táblázat: A *sea*, *seb*, *see*, *sed*, *sec* génszakaszok felszaporításához használt

PCR primerek

Gén	Primer	Nukleotid sorrend (5'-3')	Koncentráció (µmol l ⁻¹)	Méret (bp)
<i>sea</i>	GSEAR-1	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	0-2	102
<i>sea</i>	GSEAR-2	CGGCACTTTTTCTCTTCGG	0-2	102
<i>seb</i>	GSEBR-1	GTATGGTGGTGTAAGTACG	0-2	164
<i>seb</i>	GSEBR-2	CCAAATAGTGACGAGTTAGG	0-2	164
<i>see</i>	SA-U	TGTATGTATGGAGGTGTAAC	0-6	213
<i>see</i>	SA-E rev	GCCAAAGCTGTCTGAG	0-6	213
<i>sed</i>	GSEDR-1	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG	0-8	278
<i>sed</i>	GSEDR-2	ATTGGTATTTTTTTTCGTC	0-8	278
<i>sec</i>	GSECR-1	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	0-2	451
<i>sec</i>	GSECR-2	CACACTTTTAGAATCAACCG	0-2	451

18. táblázat: A *ser*, *seh* génszakaszok felszaporításához használt PCR primerek

Gén	Primer	Nunkleotid sorrend (5'-3')	Koncentráció ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Méret (bp)
<i>ser</i>	SER1	AGATGTGTTTGAATACCCTAT	0-2	123
<i>ser</i>	SER2	CTATCAGCTGTGGAGTGCAT	0-2	123
<i>seh</i>	SEH-F	CAACTGCTGATTTAGCTCAG	0-4	173
<i>seh</i>	SEH-R	CCCAAACATTAGCACCA	0-4	173

19. táblázat: A *selj*, *seh*, *seg*, *sei*, *selp* génszakaszok felszaporításához használt PCR primerek

Gén	Primer	Nunkleotid sorrend (5'-3')	Koncentráció ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Méret (bp)
<i>selj</i>	SEJ-F	GTTCTGGTGGTAAACCA	1-0	131
<i>selj</i>	SEJ-R	GCGGAACAACAGTTCTGA	1-0	131
<i>seh</i>	SEH-F	CAACTGCTGATTTAGCTCAG	0-4	173
<i>seh</i>	SEH-R	CCCAAACATTAGCACCA	0-4	173
<i>seg</i>	SEG-F	GTTAGAGGAGGTTTTATG	0-6	198
<i>seg</i>	SEG-R	TTCCTTCAACAGGTGGAGA	0-6	198
<i>sei</i>	SEI-F	GGCCACTTTATCAGGACA	0-8	328
<i>sei</i>	SEI-R	AACTTACAGGCAGTCCA	0-8	328
<i>selp</i>	SEP-F	TCAAAAGACACCGCCAA	0-8	396
<i>selp</i>	SEP-R	ATTGTCCTTGAGCACCA	0-8	396

A PCR reakciókat 25 μl végtérfigatban mértem össze az 20. táblázat alapján.

20. táblázat: Az SE gének felszaporításához használt PCR-összetétel

Bemért anyag	mennyiség/reakció
FastStart Taq DNA Polymerase	1 U
FastStart Buffer	1 U
MgCl_2	2-5 mmol l^{-1}
dezoxinukleotid trifoszfát (dNTP)	0-2 mmol l^{-1}
Primer	17., 18., 19. táblázat.
DNS templát (5x)	2 μl
Víz (ultratisztaságú)	25 μl -re kiegészítve

3.2. Eredmények

3.2.1. Módszer optimalizálása a MALDI-TOF MS vizsgálatokhoz

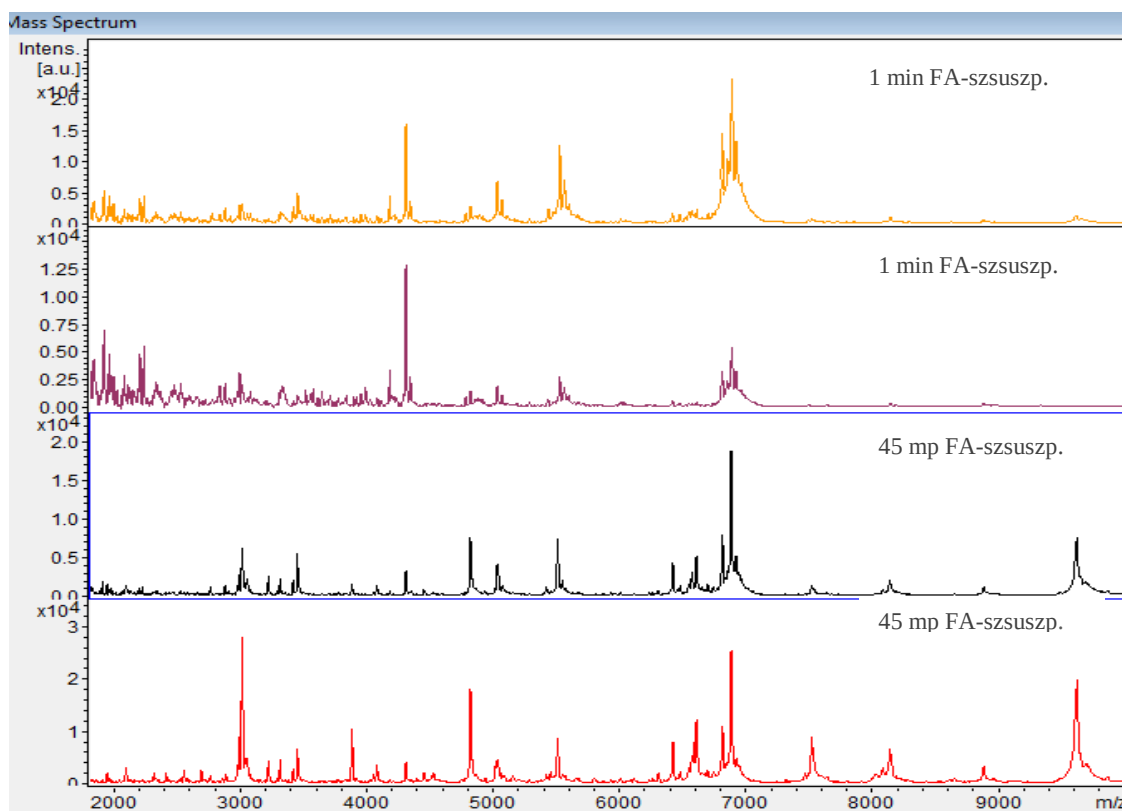
3.2.1.1. Minta-előkészítési módszerek kidolgozása

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. Az előkísérletekben 3 minta-előkészítési eljárást alkalmaztam, a direkt mintafelvitelt, a direkt mintafelvitelt hangyasavval és az etanolos extrakciót. A minta-előkészítési módszerek összehasonlítása során a törzseket Columbia véres agaron tenyésztettem 24 órán keresztül és α -HCCA mátrixot alkalmaztam melyet előző tanulmányok eredményeire alapoztam (JOSTEN és mtsai, 2013). Az eljárás kiválasztása során továbbá figyelembe vettem a minta-előkészítés eszköz és anyagigényét, valamint az időt, mint a rutin diagnosztika egyik legfontosabb tényezőjét. A tömegspektrumok elemzése az előkísérletekben (21., 22., 23. táblázat) 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.

A módosított hangyasavas szuszpendálás 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 boksiban hagytam beszáradni.

A szuszpendálási idő meghatározásához külön kísérleteket végeztem, a kiindulási pontot a DT-FA eljárásban a hangyasav lamináris boks alatti beszáradási idejének mérése adta, mely 2-2,5 perc volt. A szuszpendálási időt először 1 percre, majd 45 másodpercre redukáltam és összehasonlítottam a felvett spektrumokat, a 8. ábrán az ATCC 29213 *S. aureus* törzs tömegspektruma látható. A vizsgálatot minden referencia törzs esetében elvégeztem, a spektrumok átlag intenzitása mind a két esetben 10^4 a.u.

(tetszőleges egység) volt, azonban a 45 másodperces szuszpendálási idő után a spektrumokat alkotó csúcsok számának átlaga meghaladta a 100-at, míg ez az érték 1 perces szuszpendálást követően csak 84 volt. A fragment ionok tömegszám tartománya is nagyobb volt a 45 másodperces szuszpendálást követően, a legkisebb detektálható csúcs minden esetben 1901 m/z értéknél, a legnagyobb pedig 19084 m/z értéknél jelent meg.



8. ábra A módosított hangyasavas szuszpendálás (M-FA) során alkalmazott szuszpendálási idő hatása az ATCC 29213 *S. aureus* törzs spektrumának paramétereire

A vizsgálat során a referencia *S. aureus* törzsek spektrumait jellemző paraméterek átlagát és szórását hasonlítottam össze. A különböző minta-előkészítési eljárások hatására jelentős különbség volt a tömegspektrumokat alkotó csúcsok átlagát tekintve. A 4 eljárás közül a direkt mintafelvétel (DT) esetében detektáltam a legkevesebb csúcsot. Hangyasavas feltárással (DT-FA) kiegészítve már kedvezőbb számú (78) csúcs jelent meg a spektrumban. Etanolos extrakcióval (EtOH) detektáltam a legtöbb csúcsot (119), azonban a módosított hangyasavas szuszpendálás (M-FA) során is 100 felett volt a detektálható csúcsok száma (21. táblázat).

21. 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.)	1×10^4	1×10^4	1×10^5	1×10^4
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.

22. táblázat: A minta-előkészítési eljárások összehasonlítása az azonosítási log score értékek átlaga és szórása alapján

Referencia törzs (n=9)	Azonosítási log score értékek átlaga és szórása			
	DT	DT-FA	EtOH	M-FA
ATCC 29213	2,165 (0,067)	2,198 (0,058)	2,354 (0,032)	2,381 (0,041)
ATCC 6538	2,168 (0,042)	2,183 (0,076)	2,323 (0,046)	2,389 (0,031)
ATCC 14458	2,149 (0,056)	2,184 (0,058)	2,304 (0,041)	2,369 (0,043)
ATCC 19095	2,129 (0,057)	2,151 (0,088)	2,347 (0,068)	2,422 (0,038)
ATCC 27664	2,102 (0,088)	2,186 (0,077)	2,334 (0,054)	2,399 (0,053)
ATCC 33591	2,043 (0,048)	2,176 (0,086)	2,375 (0,029)	2,366 (0,036)
ATCC 43300	2,113 (0,082)	2,259 (0,048)	2,388 (0,047)	2,379 (0,035)
DSM 28299	2,215 (0,057)	2,251 (0,044)	2,297 (0,042)	2,380 (0,033)
DSM 28300	2,181 (0,092)	2,245 (0,051)	2,332 (0,024)	2,377 (0,047)
azonosítási log score értékének átlaga	2,141	2,203	2,340	2,384

A minta-előkészítési módszerek összehasonlítása során, végül mind a 4 eljárással elvégeztem a referencia *S. aureus* törzsek MALDI Biotyper azonosítását. Az összehasonlítás alapját az azonosítási log score értékek adták. Minden törzs esetében 6 párhuzamos mérést végeztem és az átlag log score értékeket hasonlítottam össze, valamint feltüntettem a szórás mértékét is, mely a reprodukálhatóság szempontjából fontos tényező (22. táblázat).

Az azonosítási log score érték minden alkalmazott minta-előkészítési eljárás esetében nagyobb volt, mint 2,000, tehát nemzetség szinten, minden esetben azonosítottnak tekinthető. 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 (23. táblázat).

23. táblázat: A minta-előkészítések hatása az azonosítási átlag log score értékekre

Minta-előkészítési módszerek		Átlagos eltérés	Standard hiba	Szignifikancia	95% Konfidencia intervallum	
					Alsó határ	Felső határ
DT	DT-FA	-,063111*	,017047	,004	-,10930	-,01692
	EtOH	-,198778*	,017047	,000	-,24496	-,15259
	M-FA	-,244111*	,017047	,000	-,29030	-,19792
DT-FA	DT	,063111*	,017047	,004	,01692	,10930
	EtOH	-,135667*	,017047	,000	-,18185	-,08948
	M-FA	-,181000*	,017047	,000	-,22719	-,13481
EtOH	DT	,198778*	,017047	,000	,15259	,24496
	DT-FA	,135667*	,017047	,000	,08948	,18185
	M-FA	-,045333	,017047	,056	-,09152	,00085
M-FA	DT	,244111*	,017047	,000	,19792	,29030
	DT-FA	,181000*	,017047	,000	,13481	,22719
	EtOH	,045333	,017047	,056	-,00085	,09152

* Szignifikancia szint: $p < 0,05$

A különböző módszerekkel kapott átlag log score értékek szórása egyik módszer esetében sem érte el a 0,1 értéket. A legmagasabb szórás érték 0,092 volt a DT eljárás

során, míg a legalacsonyabb 0,024 volt, az EtOH eljárással azonosított DSM 28300 törzs esetében.

Az azonosítási log score értékek eredményei alapján, az M-FA módszerrel felvett spektrumok, és az EtOH extrakcióval felvett spektrumok között nem volt szignifikáns különbség. 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. Továbbá az M-FA módszer eszköz és vegyszer igénye kisebb, mint az EtOH módszernek, ezáltal könnyebben beilleszthető a rutin laboratóriumi diagnosztikába. A további vizsgálatok során az M-FA módszert alkalmaztam (24. táblázat).

24. táblázat: Az EtOH és az M-FA eljáráshoz szükséges idő, eszközök és vegyszerek összehasonlítása

Eljáráshoz szükséges: Eszközök	Minta-előkészítési módszer	
	EtOH	M-FA
	streil oltókacs, pipetta centrifuga cső, vortex, centrifuga	streil oltókacs, pipetta centrifuga cső
Vegyszerek/minta	300 µl ioncserélt víz, 900 µl abszolút etanol, 20 µl hangyasav, 20 µl acetonitril, 1 µl mátrix oldat	20 µl hangyasav, 20 µl acetonitril, 1 µl mátrix oldat
Idő/minta	szuszpendálás: 30 mp vortex: 3 perc oldószer elpárolgás: 3-5 perc szuszpendálás: 2 perc centrifuga: 3 perc	szuszpendálás: 45 mp

3.2.1.2. Mátrix oldatok összehasonlítása

A minta-előkészítési módszer kiválasztását követően, a mátrix oldatok spektrumokra gyakorolt hatását elemeztem. A tenyésztési körülmények megegyeztek az előző, 3.2.1.1. alfejezetben leírtakkal. Az α -HCCA mátrix oldat mellé további 2 mátrix oldatot vontam be a vizsgálatokba, az SA-t és a DHB-t. A spektrumok összehasonlításának alapját, jelen esetben is a spektrumokat alkotó csúcsok száma, a teljes spektrum intenzitása és a detektált legkisebb és legnagyobb m/z értékű csúcsok adták. A vizsgálatot minden referencia *S. aureus* törzs esetében elvégeztem, a 25. táblázatban a vizsgált paraméterek

átlag értékeit mutatom be. A detektálható csúcsok átlaga között szignifikáns különbség volt megfigyelhető a különböző mátrix oldatok alkalmazása során (26. táblázat).

25. 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

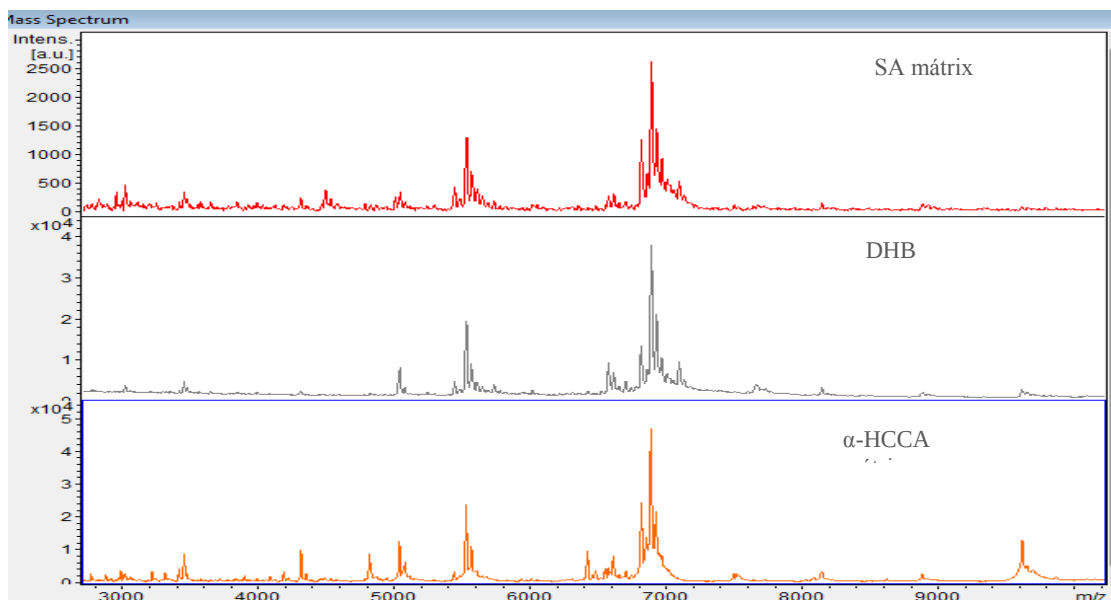
26. táblázat: A mátrix oldatok hatása a detektálható csúcsok számára

Alkalmazott mátrix oldatok		Átlagos eltérés	Standard hiba	Szignifi- kancia	95% Konfidencia intervallum	
					Alsó határ	Felső határ
SA	DHB	11,667*	1,019	,000	9,12	14,21
	HCC A	-5,556*	1,019	,000	-8,10	-3,01
DHB	SA	-11,667*	1,019	,000	-14,21	-9,12
	HCC A	-17,222*	1,019	,000	-19,77	-14,68
HCCA	SA	5,556*	1,019	,000	3,01	8,10
	DHB	17,222*	1,019	,000	14,68	19,77

*Szignifikancia szint: $p < 0,05$

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 megjelent csúcsok számának átlaga 100 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.

A 9. ábra a 3 mátrix oldattal detektált ATCC 29213 *S. aureus* törzs spektrumait szemlélteti. A spektrumok felbontása és intenzitása valamint a detektálható tömegszám tartomány alapján az α -HCCA mátrix oldatot alkalmaztam a későbbi vizsgálatok során.



9. ábra Az SA, DHB és α -HCCA mátrix ATCC 29213 *S. aureus* törzs spektrumaira gyakorolt hatása

3.2.1.3. Táptalajok és a tenyésztési idő összehasonlítása

A vizsgálatok során elemeztem a különböző táptalajon tenyésztett referencia törzsek spektrumait. A 4 különböző táptalaj spektrumokra gyakorolt hatásait ebben az esetben is a spektrumok felbontása és intenzitása, valamint a detektálható tömegszám tartomány alapján elemeztem. A vizsgálatot minden referencia *S. aureus* törzs esetében elvégeztem, a 27. táblázatban a vizsgált paraméterek átlag értékeit mutatom be. A Baird-Parker (BP) szelektív táptalajon tenyésztett törzsek spektrumaiban a detektálható csúcsok számának átlaga 62 volt, mely jelentősen kevesebb volt a másik 3 esethez viszonyítva. A Mueller-Hinton (MH) és a Csokoládé agar (CS) esetében a detektálható csúcsok száma már kedvezőbben alakult, azonban az intenzitás mértéke kisebb volt mind a két esetben, a Columbia véres agaron (C) tenyésztett törzsek spektrumaihoz viszonyítva. A CS és C agaron való tenyésztés során, a detektálható csúcsok számának átlaga között nem volt szignifikáns különbség (28. táblázat). A legkedvezőbb vizsgálati paramétereket a Columbia véres agar esetében kaptam.

27. táblázat: Az alkalmazott táptalajok hatása a spektrumok paramétereire

Vizsgált paraméter	Alkalmazott táptalajok			
	BP	MH	CS	C
Detektálható csúcsok számának átlaga,	62	98	102	104
szórása (db)	(2,45)	(3,00)	(2,69)	(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

28. táblázat: A különböző táptalajok hatása a detektált csúcsok számára

Alkalmazott táptalajok		Átlagos eltérés	Standard hiba	Szignifikancia	95% Konfidencia intervallum	
					Alsó határ	Felső határ
BP	MH	-35,667*	1,180	,000	-38,86	-32,47
	CS	-39,556*	1,180	,000	-42,75	-36,36
	C	-41,556*	1,180	,000	-44,75	-38,36
MH	BP	35,667*	1,180	,000	32,47	38,86
	CS	-3,889*	1,180	,012	-7,09	-,69
	C	-5,889*	1,180	,000	-9,09	-2,69
CS	BP	39,556*	1,180	,000	36,36	42,75
	MH	3,889*	1,180	,012	,69	7,09
	C	-2,000	1,180	,343	-5,20	1,20
C	BP	41,556*	1,180	,000	38,36	44,75
	MH	5,889*	1,180	,000	2,69	9,09
	CS	2,000	1,180	,343	-1,20	5,20

*Szignifikancia szint: $p < 0,05$

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, majd M-FA minta-előkészítéssel és α -HCCA mátrix oldattal felvettem az összehasonlítani kívánt spektrumokat. A 24 h és a 48 h tenyésztési időt követően a detektálható csúcsok száma között nem volt szignifikáns különbség (30. táblázat). A spektrumok intenzitása és a tömegszám tartomány mind a 3 esetben azonos volt (29. táblázat).

29. táblázat: A tenyésztési idő hatása a spektrumok paramétereire

Vizsgált paraméter	Tenyésztési idő		
	24 h	48 h	72 h
Detektálható csúcsok számának átlaga, szórása (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

30. táblázat: A tenyésztési idő hatása a detektálható csúcsok számára

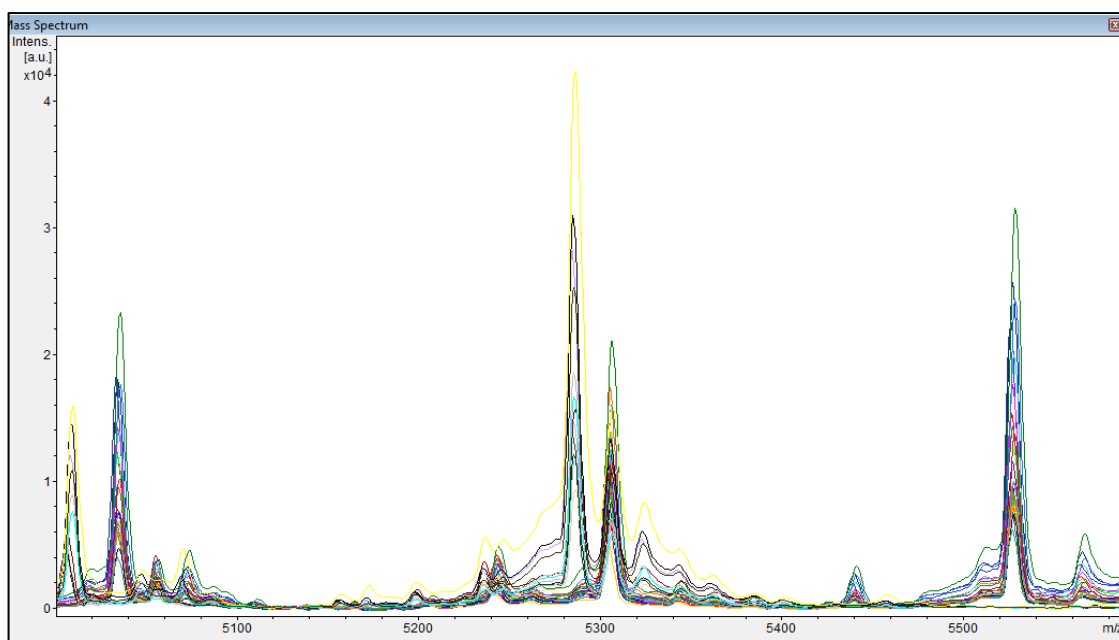
Tenyésztési idő		Átlagos eltérés	Standard hiba	Szignifikancia	95% Konfidencia intervallum	
					Alsó határ	Felső határ
24 h	48 h	1,111	1,033	,538	-1,47	3,69
	72 h	27,444*	1,033	,000	24,86	30,03
48 h	24 h	-1,111	1,033	,538	-3,69	1,47
	72 h	26,333*	1,033	,000	23,75	28,91
72 h	24 h	-27,444*	1,033	,000	-30,03	-24,86
	48 h	-26,333*	1,033	,000	-28,91	-23,75

*Szignifikancia szint: $p < 0,05$.

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 24 h és 48 h tenyésztési időt követően az 1900-4306 m/z tartományban a detektálható csúcsok számának átlaga 21 volt, ugyanez az érték 72 h tenyésztési idő után 14-re csökkent. A vizsgált paraméterek alapján a további mérések esetében a 24 h tenyésztési időt alkalmaztam.

3.2.2. A spektrumok kalibrálásához szükséges csúcsok meghatározása

A kalibráláshoz szükséges referencia csúcsok meghatározását a referencia törzsek spektrumainak vizuális elemzésével kezdtem el (10. ábra). Az egymásra illesztett spektrumokban olyan csúcsokat kerestem, melyek minden törzs esetében detektálhatók voltak, majd ezt követően a meghatározott csúcsok m/z értékeiből átlagot számítottam. Létrehoztam egy új kalibrálási módszerfájlt, amibe a meghatározott referencia csúcsok m/z értékeit vittem be, majd egyesével elvégeztem a törzsek kalibrációját.



10. ábra A referencia csúcsok meghatározása során, az egymásra illesztett spektrumok

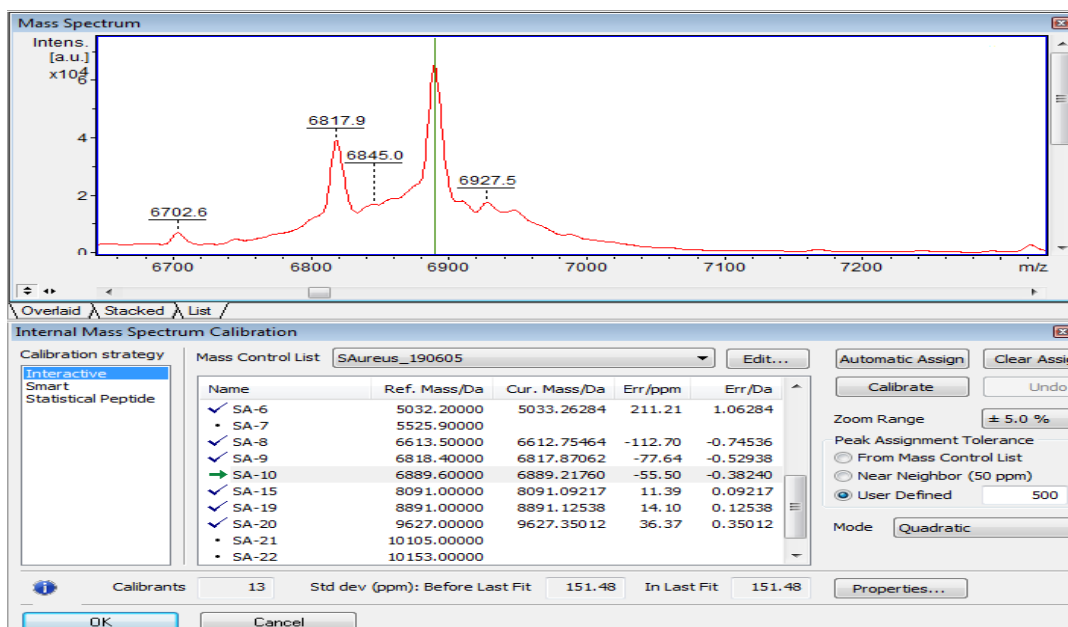
A kalibráláshoz 7 referencia csúcsot határoztam meg, amely minden referencia törzsben jelen volt, beleértve a *S. argenteus* és *S. schweitzeri* törzseket is. A szoftver az azonosított tömeg/töltés értékeket is megjeleníti, valamint a hiba mértékét a referencia csúcsához viszonyítva. Az azonosított tömeg/töltés értékek és a hiba mértékének átlagát a 31. táblázat szemlélteti. A kalibrálás során a legnagyobb Da eltérést (hibát) a 6613,5 referencia csúcs azonosításánál tapasztaltam, azonban minden esetben kisebb volt a hiba mértéke, mint 1.

31. táblázat: A kalibráláshoz alkalmazott csúcsok

Csúcs azonosító	Referencia tömeg/töltés	Azonosított tömeg/töltés	Hiba mértéke (Da)	Tesztelt referencia törzsek
SA-1	3891,1	3890,8	0,3	ATCC 29213, ATCC 6538, ATCC 14458, ATCC 19095, ATCC 27664, ATCC-33591, ATCC 43300, DSM 28299, DSM 28300
SA-4	4818,1	4817,6	0,5	
SA-8	6613,5	6612,9	0,6	
SA-10	6889,6	6889,3	0,3	
SA-15	8091,0	8091,1	0,1	
SA-19	8891,0	8891,1	0,1	
SA-20	9627,0	9627,5	-0,5	

A meghatározott referencia tömeg/töltés értékek ellenőrzését is lehetővé teszi a szoftver és amennyiben a módszerfájl tartalmaz olyan csúcsokat, amelyek nincsenek jelen az adott izolátumban, annak ellenére elfogadható a kalibráció. A 11. ábrán egy

élelmiszerből izolált *S. aureus* törzs spektrumának kalibrálása figyelhető meg *FlexAnalysis* 3.4 szoftverben. A törzsek kalibrálása lehetővé tette a pontosabb tömeg/töltés értékek meghatározását, amely nélkülözhetetlen a spektrumok összehasonlítása és elemzése során.



11. ábra Élelmiszerből izolált *S. aureus* törzs spektrumának kalibrálása

3.2.3. Izolátumok azonosítása MALDI Biotyper szoftverrel

Az MSZ EN ISO 6888-1:2008 szabvány és latex agglutinációs tesztel meghatározott, élelmiszerekből és haszonállatokból izolált *S. aureus* törzsek faj és alfaj szintű azonosítását MALDI Biotyper szoftver segítségével is elvégeztem. A törzseket Columbia véres agaron inkubáltam 24 h keresztül, majd M-FA minta-előkészítési módszert és α -HCCA mátrixot alkalmazva vettem fel az izolátumok tömegspektrumait. A 47 élelmiszerből izolált törzs vizsgálata során minden izolátumot 2,300 log score érték felett azonosítottam, tehát minden esetben biztonságosnak tekinthető a faj és alfaj meghatározása (32. táblázat). Az izolátumok 56%-át 2,400 log score érték fölött azonosítottam.

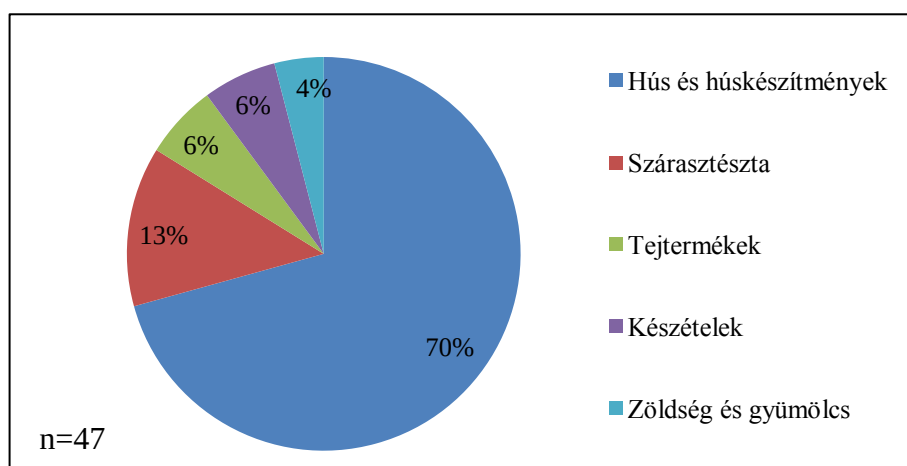
32. táblázat: Az élelmiszerekből izolált törzsek azonosítási eredményei

Élelmiszer kategória	Azonosító	Élelmiszer megnevezése	score érték	Azonosítás eredménye*
Tejtermék	SA-1	Trappista sajt	2,458	1
	SA-10	Trappista sajt	2,440	1
	SA-18	Tejes desszert	2,513	1
Száraztészta	SA-2	Száraztészta	2,476	1
	SA-49	Száraztészta	2,308	1
	SA-7	Száraztészta	2,304	1
	SA-21	Száraztészta	2,486	1
	SA-22	Száraztészta	2,448	1
	SA-11	Száraztészta	2,429	1
Hús	SA-12	Csirkecomb	2,465	1
	SA-13	Csirkecomb	2,345	2
	SA-16	Pácolt csirke	2,332	2
	SA-44	Egész kacs	2,401	1
	SA-17	Libamáj	2,447	1
	SA-20	Kacsatál	2,432	1
	SA-28	Kacs comb	2,353	3
	SA-29	Kacs tepertő	2,571	1
	SA-4	Császár szalonna	2,319	3
	SA-31	Bacon	2,546	1
	SA-5	Kolbász	2,477	1
	SA-6	Karaj	2,366	1
	SA-32	Karaj	2,466	1
	SA-25	Kolbász	2,429	1
	SA-33	Karaj	2,329	1
	SA-24	Lapocka	2,343	1
	SA-34	Karaj	2,350	1
	SA-9	Lapocka	2,425	1
	SA-35	Lapocka	2,500	1
	SA-36	Lapocka	2,387	3
	SA-37	Lapocka	2,429	1
	SA-15	Tepertő	2,342	3
	SA-38	Sütnivaló kolbász	2,474	1
	SA-02	Lapocka	2,383	3
	SA-01	Kolbász	2,395	2
	SA-39	Csülök	2,562	1
	SA-40	Csülök	2,516	1
	SA-41	Fej	2,403	2
	SA-47	Tarja	2,354	1
	SA-3	Marhahús	2,333	1
	SA-8	Marhahús	2,484	3
	SA-48	Belsőség	2,362	3
Vadhús	SA-42	Nyúlhús	2,371	1
Készételek	SA-43	Hamburger hús	2,382	3
	SA-50	Grill csirke	2,305	2
	SA-45	Csokoládé	2,339	1
Zöldségek	SA-46	Friss saláta mix	2,525	1
	SA-27	Sárgarépa pástétom	2,421	1

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

Az azonosítás során a Biotyper szoftver a könyvtárában található referencia *S. aureus* spektrumokhoz hasonlítja az azonosítani kívánt izolátum spektrumát, mely alapján a törzsek 72%-a a *S. aureus* subsp. *aureus* DSM 799 tömegspektrumával mutatta a legnagyobb hasonlóságot. A csúcsok jelenléte és szimmetriája alapján, az izolátumok 11%-a esetében a *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* DSM 20231T referencia törzs, míg a törzsek 17%-a esetében pedig a *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 referencia törzs volt a legközelebbi azonosítási találat.

A vizsgálat során 5 különböző élelmiszercsoportból azonosítottam *S. aureus* törzseket, melyek 70%-át hús és húskészítményekből, 13%-át száraztésztaiból izoláltam (12. ábra).



12. 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 (33. táblázat).

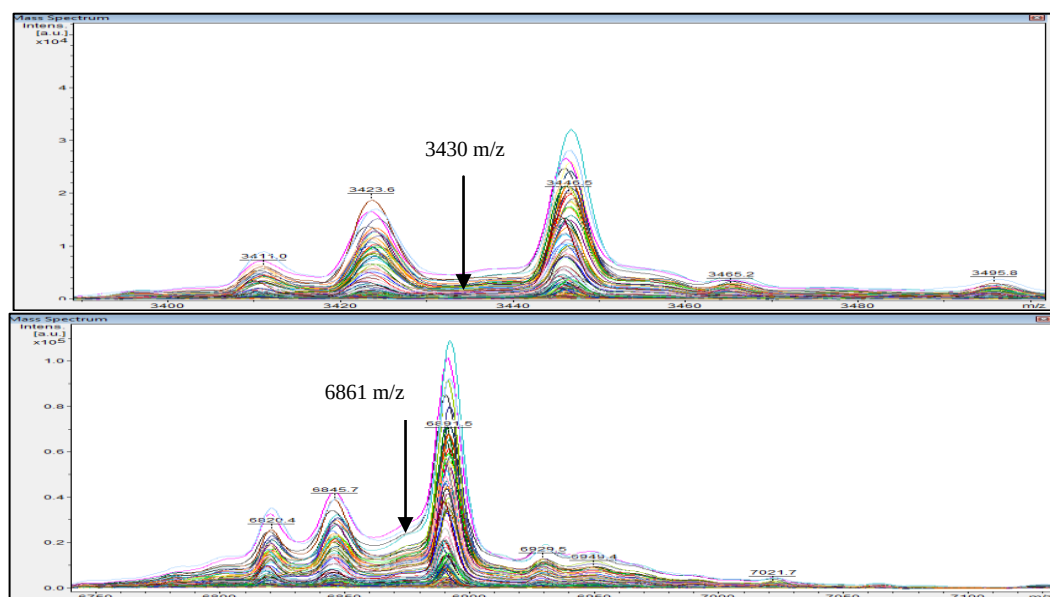
A MALDI Biotyper szoftverrel történő azonosítás eredményei alapján minden élelmiszerből és haszonállatból izolált törzs *S. aureus* subsp. *aureus* fajnak bizonyult, tehát az egyéb koaguláz-pozitív *Staphylococcus* fajok és a *S. aureus* subsp. *anaerobius* alfaj jelenléte kizárható. Az alfajok közötti elkülönítést a tömegspektrumokban megjelenő specifikus csúcsok teszik lehetővé.

33. 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

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 kizárhattam a két specifikus csúcs jelenlétét (13. ábra).



13. ábra A *S. aureus* subsp. *anaerobius* alfajra jellemző specifikus csúcsok hiánya az izolátumokban

3.2.4. 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 (34. táblázat). Az elemzés során minden törzs esetében 6 párhuzamos mérést végeztem.

A 29 csúcs mindegyikét sikerült detektálni a referencia törzsekben, azonban 8 csúcs eltérő fajban/fajokban jelent meg az előző tanulmányokban leírt eredményekhez viszonyítva. A 6889 m/z csúcs az előző tanulmányokban csak a *S. argenteus* törzsekben volt detektálható, míg jelen vizsgálat során mind a három fajban megjelent. A 10105 m/z csúcs nem jelent meg mind a három faj tömegspektrumában, a *S. schweitzeri* törzsben nem volt detektálható. Az 5045 m/z csúcsot a *S. aureus* törzsekben is azonosítottam, nem csak az *S. schweitzeri* törzsekben. A 6613 m/z csúcs a *S. schweitzeri* törzsekben is megjelent, nem csak a *S. aureus* törzsekben. Az előző tanulmányokban az 5002 m/z csúcs csak az *S. aureus* törzsekben jelent meg, míg jelen tanulmányban, csak a *S. argenteus* törzsben volt detektálható. A 2289 m/z és 3007 m/z csúcsokat nem tudtam mind a három fajban detektálni, csak a *S. aureus* törzsekben. A többi csúcs esetében nem volt eltérés.

34. 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 spektrumok további elemzésével meghatároztam 8 olyan specifikus csúcsot, melyek lehetővé teszik a fajok elkülönítését és azonosítását (35. táblázat). A 2641 m/z, 5286 m/z csúcsokat csak a *S. argenteus* és a *S. schweitzeri* törzsekben tudtam detektálni, egyik referencia *S. aureus* törzsben sem jelentek meg. Azonosítottam egy olyan csúcsot 5032 m/z értéknél, amely csak a *S. aureus* törzsekben volt detektálható. Továbbá *S. schweitzeri* specifikus csúcsnak tekinthető, a 3453 m/z, 6908 m/z és 4911 m/z, melyek a másik két fajban nem jelentek meg. A specifikus csúcsokról készült felvételeket az 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. és 8. melléklet tartalmazza.

35. táblázat: Az általam meghatározott 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

A vizsgálat során azokat a csúcsokat, amelyek mind a három fajban detektálhatók voltak, összehasonlítottam a relatív intenzitásuk alapján (36. táblázat). A törzsekben detektálható csúcsok relatív intenzitását a párhuzamos mérések átlaga alapján hasonlítottam össze. A *S. argenteus* és a *S. aureus* törzsek esetében a legmagasabb relatív intenzitással a 6889 m/z csúcsot detektáltam, míg a *S. schweitzeri* esetében a legmagasabb relatív intenzitása a 9627 m/z csúcsnak volt. A 2636 m/z csúcs relatív intenzitása a *S. argenteus* és *S. schweitzeri* esetében nem érte el az 5%-ot, a *S. aureus* esetében ez 41% volt. A *S. aureus* törzsekben a vizsgált csúcsok átlag relatív intenzitása 32,5% volt, a *S. argenteus* esetében ugyanez az érték 25%, míg a *S. schweitzeri* esetében 13% volt.

A szórás értéke változatosan alakult a detektált csúcsok valamint fajok függvényében. A legjelentősebb eltérést a *S. aureus* fajban detektált 4306 m/z fragment ion relatív intenziáts értékei esetében tapasztaltam, a szórás értéke ebben az esetben meghaladta a 11-et. A legkisebb szórás értéket (0,54) a *S. schweitzeri* faj tömegspektrumában detektálható 2636 m/z fragment ion relatív intenzitás értékei esetében kaptam.

36. táblázat: A három fajban detektálható csúcsok relatív intenzitásának összehasonlítása

Vizsgált ion fragment értékek	Relatív intenzitás értékeinek átlaga és szórása		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. argenteus</i>	<i>S. schweitzeri</i>
2636 m/z	41% (2,42)	1% (0,75)	1% (0,55)
3891 m/z	28% (2,16)	6% (3,62)	8% (3,93)
4306 m/z	49% (11,98)	29% (0,84)	21% (1,38)
4814 m/z	29% (0,75)	43% (3,82)	26% (1,33)
6354 m/z	15% (1,51)	10% (1,37)	8% (3,08)
6889 m/z	69% (6,75)	100% (0,84)	17% (2,73)
8091 m/z	11% (4,40)	5% (3,44)	5% (2,56)
8891 m/z	8% (1,63)	2% (1,17)	2% (0,63)
9627 m/z	43% (2,16)	29% (2,71)	29% (1,51)

37. táblázat: A három fajban detektálható csúcsok jel/zaj (S/N) arányának összehasonlítása

Vizsgált ion fragment értékek	S/N értékek átlaga és szórása		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. argenteus</i>	<i>S. schweitzeri</i>
2636 m/z	82 (7,03)	5 (2,81)	4 (1,63)
3891 m/z	68 (2,04)	12 (2,56)	16 (0,52)
4306 m/z	97 (5,75)	41 (3,50)	41 (5,12)
4814 m/z	71 (5,67)	98 (1,41)	57 (2,07)
6354 m/z	24 (1,37)	31 (2,07)	39 (1,10)
6889 m/z	127 (10,50)	152 (10,15)	32 (3,85)
8091 m/z	35 (1,51)	27 (0,98)	12 (2,79)
8891 m/z	28 (103)	8 (0,41)	6 (2,16)
9627 m/z	84 (1,21)	83 (1,94)	81 (2,93)

A csúcsok detektálásának minősége függ a jel/zaj aránytól is, mivel a magasabb jel/zaj arány növeli a csúcsok mérésének precizitását, ezáltal csökkentve a mérési bizonytalanságot. A három fajban detektálható azonos csúcsok jel/zaj arányának

elemzését is elvégeztem. Az összehasonlítást a párhuzamos mérések átlaga alapján végeztem el (37. táblázat).

A vizsgálat során 9 olyan csúcs jel/zaj arányát hasonlítottam össze, amelyek mind a három fajban megjelentek, azonban eltérő volt a relatív intenzitásuk. A *S. argenteus* és a *S. schweitzeri* izolátumok esetében a 2636 m/z és 8891 m/z csúcs detektálása során nőtt a zajszint, a *S. aureus* izolátumokban detektált ugyanezen csúcsok zajszintjéhez viszonyítva, ezáltal 10 alá csökkent a jel/zaj arány. A többi csúcs esetében viszonylag magas jel/zaj arány értékeket kaptam, ezáltal kizárható a nem valódi csúcsok jelenléte.

A legmagasabb szórás értéket a *S. aureus* fajban detektált 6889 m/z ion fragment jel/zaj arányának értékei esetében kaptam (10,5), míg a legkisebb szórás értéket a 8891 m/z érték detektálása során az *S. argenteus* fajban (0,41).

3.2.4.1. A specifikus csúcsok tesztelése az élelmiszerekből és haszonállatokból izolált törzsekben

Az előző tanulmányokban meghatározott specifikus csúcsok és referencia törzsek tömegspektrumainak összehasonlítása alapján 7 olyan specifikus csúcsot határoztam meg, amelyek a *S. aureus* törzsekben nem voltak detektálhatók, azonban a *S. argenteus* és *S. schweitzeri* referencia törzsek tömegspektrumaiban megjelentek (38. táblázat).

38. táblázat: A *S. argenteus* és *S. schweitzeri* törzsek specifikus csúcsai

Faj	m/z
<i>S. argenteus</i> / <i>S. schweitzeri</i>	2641
<i>S. schweitzeri</i>	3453
<i>S. schweitzeri</i>	4911
<i>S. argenteus</i>	5002
<i>S. argenteus</i> / <i>S. schweitzeri</i>	5286
<i>S. argenteus</i>	6580
<i>S. schweitzeri</i>	6908

Azokat a specifikus csúcsokat, melyek lehetővé teszik a három faj elkülönítését, leteszteltem az élelmiszerekből és haszonállatokból izolált törzsek tömegspektrumain is.

Az élelmiszerekből és a haszonállatokból izolált törzsek tömegspektrumaiban egyik *S. argenteus* és *S. schweitzeri* specifikus csúcsot sem detektáltam. A vizsgálat során a specifikus csúcsok jelenlétét *FlexAnalysis* 3.4 szoftverben és Excel programban

vizsgáltam. A törzsekről készített spektrumok felvételeit a 9., 10., 11. és 12. melléklet, míg az összesített Excel táblázatot a 13. és 14. melléklet tartalmazza.

39. táblázat: Fajspecifikus csúcsok előfordulási gyakorisága az élelmiszerekből és haszonállatokból izolált *S. aureus* törzsekben

m/z	Faj	Előfordulási gyakoriság (%)	
		Élelmiszerekből izolált törzsek (n=47)	Haszonállatokból izolált törzsek (n=13)
2636	<i>S. aureus/ S. argenteus/ S. schweitzeri</i>	41	69
3891	<i>S. aureus/ S. argenteus/ S. schweitzeri</i>	37	31
4306	<i>S. aureus/ S. argenteus/ S. schweitzeri</i>	72	85
4814	<i>S. aureus/ S. argenteus/ S. schweitzeri</i>	93	100
6354	<i>S. aureus/ S. argenteus/ S. schweitzeri</i>	100	100
6889	<i>S. aureus/ S. argenteus/ S. schweitzeri</i>	100	100
8091	<i>S. aureus/ S. argenteus/ S. schweitzeri</i>	100	100
8891	<i>S. aureus/ S. argenteus/ S. schweitzeri</i>	100	100
9627	<i>S. aureus/ S. argenteus/ S. schweitzeri</i>	100	100
10105	<i>S. aureus/ S. argenteus</i>	78	62
5045	<i>S. aureus/ S. schweitzeri</i>	2	23
6613	<i>S. aureus/ S. schweitzeri</i>	85	100
3037	<i>S.aureus / S. argenteus</i>	20	38
2201	<i>S.aureus</i>	26	23
2289	<i>S.aureus</i>	52	54
2307	<i>S.aureus</i>	17	54
2685	<i>S.aureus</i>	35	46
3007	<i>S.aureus</i>	83	92
3875	<i>S.aureus</i>	100	100
4485	<i>S.aureus</i>	11	62
4497	<i>S.aureus</i>	52	23
5507	<i>S.aureus</i>	52	31
5525	<i>S.aureus</i>	87	54
5539	<i>S.aureus</i>	7	23
5551	<i>S.aureus</i>	33	15
6423	<i>S.aureus</i>	100	100
6552	<i>S.aureus</i>	100	100
2762	<i>S.aureus</i>	100	100
5032	<i>S.aureus</i>	100	100

A további specifikus csúcsok közül, melyek a *S. aureus* fajra is jellemzőek, 10 csúcs minden élelmiszerből és haszonállatból izolált törzsben megjelent (39. táblázat). Továbbá a haszonállatokból izolált törzsekben, a 4814 m/z és a 6613 m/z csúcs minden izolátumban detektálható volt. Az általam meghatározott *S. aureus* specifikus csúcs, az 5032 m/z is minden izolátum spektrumában megjelent. Az élelmiszerekből izolált

törzsek esetében, több mint 50%-os gyakorisággal 9 csúcsot detektáltam, a használatokból izolált törzsek esetében pedig 8 csúcsot. A *S. aureus* specifikus csúcsok közül 5 csúcs (6423 m/z, 6552 m/z, 2762 m/z, 5032 m/z) minden izolátumban megjelent.

3.2.5. 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 MALDI-TOF MS vizsgálatokhoz a törzseket Columbia véres agaron inkubáltam 24 h keresztül, majd M-FA minta-előkészítést és α -HCCA mátrixot alkalmazva felvettem a törzsek tömegspektrumait. A vizsgálat során, az előző tanulmányokban meghatározott 10 különböző MRSA specifikus csúcsot (5. táblázat) teszteltem, a referencia MSSA és MRSA törzseken (40. táblázat).

40. 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. A többi esetben, vagy egyik törzsben sem volt detektálható az adott csúcs, vagy az MSSA és MRSA törzsekben egyaránt megjelentek. Az előző tanulmányokban meghatározott MRSA specifikus csúcsok közül 6 csúcs (2127 m/z, 2414 m/z, 4607 m/z, 6885 m/z, 9216 m/z és a 10152 m/z) nem jelent meg egyik MSSA törzsben sem (38.

táblázat). Azonban nem volt olyan csúcs, amely minden MRSA referencia törzs és MRSA izolátum spektrumában detektálható volt. A 3043 m/z csúcs a PBP2a (penicillin binding protein 2A) fehérje egyik fragmense SOGAWA és mtsai, (2017) szekvenálási eredményei alapján, ennek ellenére a 3043 m/z és a 9632 m/z csúcsok megjelentek minden MSSA törzs tömegspektrumában.

Az általam meghatározott specifikus csúcsokat (41. táblázat) a 40. táblázatban felsorolt referencia törzsek spektrumainak elemzése során határoztam meg. Az MRSA törzsek diverzitását figyelembe véve a referencia törzsek spektrumaiban meghatározott specifikus csúcsok nem alkalmazhatóak biztonságosan az izolátumok esetében, ezért a haszonállatok és a klinikai MRSA izolátumok spektrumait is elemeztem az előző tanulmányok és az általam meghatározott specifikus csúcsok alapján (15. és 16. melléklet).

41. táblázat: Általam meghatározott MRSA specifikus csúcsok

Marker azonosító	MRSA specifikus csúcs (m/z)
MRSA-7	2453
MRSA-8	4461
MRSA-22	2548
MRSA-13	2718
MRSA-9	3885

Az általam meghatározott MRSA specifikus csúcsok közül a 4461 m/z és a 2548 m/z csúcsok a klinikai mintákból izolált MSSA törzsek 50%-ában detektálhatók voltak (42. táblázat). A 2453 m/z csúcs, függetlenül a rezisztencia jelenlététől, nem jelent meg a klinikai mintákból izolált törzsek spektrumában és a haszonállatokból izolált MRSA törzsek mindössze 8%-ában volt detektálható. A 2718 m/z és a 3885 m/z csúcsok a klinikai mintákból izolált MRSA törzsek 50%-ában és minden haszonállatból izolált MRSA törzs tömegspektrumában megjelentek. Ezeket a csúcsokat nem detektáltam egyik MSSA törzs esetében sem.

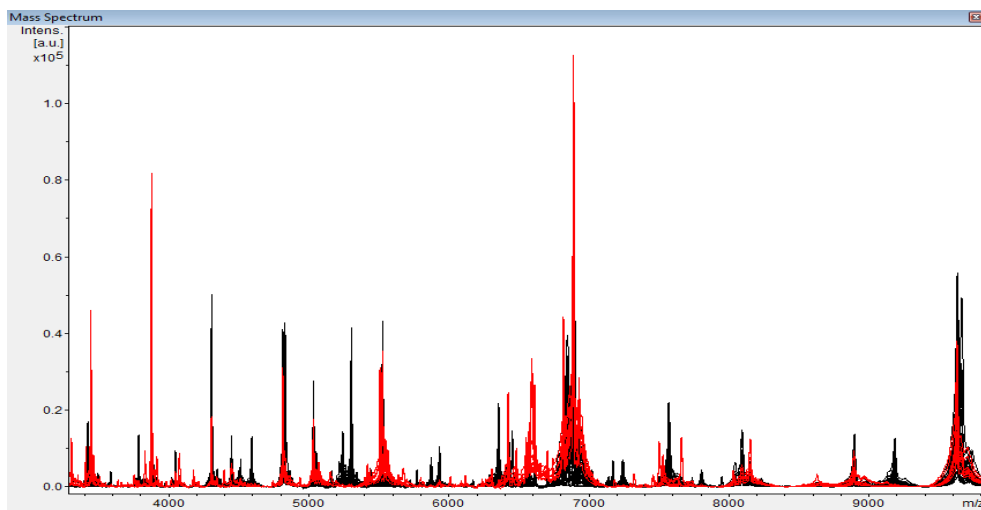
42. táblázat: Az MRSA specifikus csúcsok előfordulási gyakorisága a haszonállatokból izolált MRSA és a klinikai mintákból izolált MRSA és MSSA törzsekben

MRSA specifikus csúcsok (m/z)	Előfordulási gyakoriság (%)		
	Klinikai mintákból izolált MRSA törzsek (n=4)	Klinikai mintákból izolált MSSA törzsek (n=4)	Haszonállatokból izolált MRSA törzsek (n=13)
2127	0	0	15
2414	100	0	38
3043	100	100	62
4607	0	0	31
5070	50	0	100
6576	0	0	85
6885	100	0	31
9216	25	0	38
9632	0	100	100
10152	50	0	8
2453	0	0	8
4461	0	50	100
2548	50	50	100
2718	50	0	100
3885	50	0	100

3.2.6. Az élelmiszerekből izolált *S. aureus* törzsek methicillin-rezisztenciájának feltérképezése

3.2.6.1. MRSA specifikus csúcsok vizsgálata az élelmiszerekből izolált törzsek tömegspektrumaiban

Az élelmiszerekből izolált törzsek spektrumainak manuális elemzése során az MRSA specifikus csúcsok jelenlétét, illetve hiányát vizsgáltam. Minden törzs esetében 6 párhuzamost mérést végeztem és a felvett spektrumokat két különböző módszerrel elemeztem. A spektrumok vizuális elemzését a *FlexAnalysis 3.4* szoftverben végeztem el és a methicillin-rezisztensnek bizonyult SA-17-es és SA-47-es törzset piros, míg a többi törzset fekete színnel jelöltem (14. ábra). A felvett tömegspektrumok egymásra illesztése és az eltérő színek alkalmazása lehetővé tette a specifikus csúcsok gyors elemzését.



14 ábra Élelmiszerekből izolált 47 törzs elemzése *FlexAnalysis 3.4* programban

A vizuális elemzést követően, a csúcsokhoz tartozó tömegszám értékeket *Excel* programban elemeztem (17. melléklet). Összesen, 15 MRSA specifikus csúcsot teszteltem le az élelmiszerekből izolált törzsek esetében is.

43. 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

Az előző tanulmányokban meghatározott specifikus csúcsok közül a 2127 m/z, a 2414 m/z és a 6885 m/z csúcsokat csak a libamájból (SA-17) és a sertés tarjából (SA-47) izolált törzsekben detektáltam (43. táblázat). Az általam meghatározott specifikus csúcsok közül, a 2453 m/z és a 2718 m/z csúcs csak az SA-17-es és SA-47-es törzsekben jelent meg, a többi törzs esetében ezeket a csúcsokat nem detektáltam. A 10152 m/z csúcs a két MRSA törzs közül csak az SA-47-es sertés tarjából izolált törzsben jelent meg, az SA-17-es törzsben nem tudtam detektálni.

A tesztelt csúcsok közül 5 csúcs (3043 m/z, 5070 m/z, 6576 m/z, 9632 m/z és 2548 m/z) a methicillin-szenzitív törzsek (n=45) több mint 50%-ában megjelent. A 4461 m/z csúcs a törzsek 46%-ában jelent meg és 4 csúcsot (4607 m/z, 9216 m/z, 10152 m/z és 3885 m/z) egyik izolátumban sem detektáltam.

3.2.6.2. Korongdiffúziós módszer eredményei

A methicillin-rezisztencia meghatározása során a korongdiffúziós (Cefoxitin 30 µg) módszert minden élelmiszerből izolált törzs esetében kétszer ismételtük meg, valamint a referencia MSSA és MRSA törzseken is elvégeztem a vizsgálatot. Amennyiben a feltisztulási zóna 6-19 mm közé esett, *mecA* pozitívnak tekintettem az adott törzset.

Minden MRSA referencia törzs esetében kisebb volt a feltisztulási zóna, mint 19 mm és minden MSSA törzs esetében nagyobb volt, mint 20 mm. A 47 törzs vizsgálata során, 45 törzs esetében a feltisztulási zóna 23-29 mm közé esett (44. táblázat). Az SA-17 törzs feltisztulási zónája 9 mm volt, a SA-47 törzs feltisztulási zónája pedig 17 mm volt, tehát a vizsgálat alapján, mind a két *S. aureus* törzs methicillin-rezisztens.

44. táblázat: Korongdiffúziós módszer eredményei az élelmiszerekből izolált törzsek

esetében			
Élelmiszer kategória	Azonosító	Élelmiszer megnevezése	Feltisztulási zóna (mm)
Tejtermék	SA-1	Trappista sajt	24
	SA-10	Trappista sajt	26
	SA-18	Tejes desszert	25
Száraztészta	SA-2	Száraztészta	25
	SA-49	Száraztészta	28
	SA-7	Száraztészta	23
	SA-21	Száraztészta	27
	SA-22	Száraztészta	24
	SA-11	Száraztészta	25
	SA-12	Csirkecomb	23
Baromfi	SA-13	Csirkecomb	27
	SA-16	Pácolt csirke	24
	SA-44	Egész kacs	28
	SA-17	Libamáj	9
	SA-20	Kacsatál	24
	SA-28	Kacs comb	23
	SA-29	Kacs tepertő	26
	SA-4	Császár szalonna	23
	SA-31	Bacon	26
	SA-5	Kolbász	26
Hús	SA-6	Karaj	23
	SA-32	Karaj	26
	SA-25	Kolbász	25
	SA-33	Karaj	23
	SA-24	Lapocka	28
	SA-34	Karaj	29
	SA-9	Lapocka	23
	SA-35	Lapocka	24
	SA-36	Lapocka	23
	SA-37	Lapocka	24
	SA-15	Tepertő	25
	SA-38	Sütnivaló kolbász	26
	SA-02	Lapocka	26
	SA-01	Kolbász	23
	SA-39	Csülök	24
	SA-40	Csülök	26
	SA-41	Fej	23
	SA-47	Tarja	17
	SA-3	Marhahús	29
	SA-8	Marhahús	25
	SA-48	Belsőség	28
	SA-42	Nyúlhús	24
Készételek	SA-43	Hamburger hús	23
	SA-50	Grill csirke	28
	SA-45	Csokoládé	23
Zöldségek	SA-46	Friss saláta mix	28
	SA-27	Sárgarépa pástétom	25

3.2.6.3. MRSA CHROMagar szelektív, differenciáló táptalaj vizsgálati eredményei

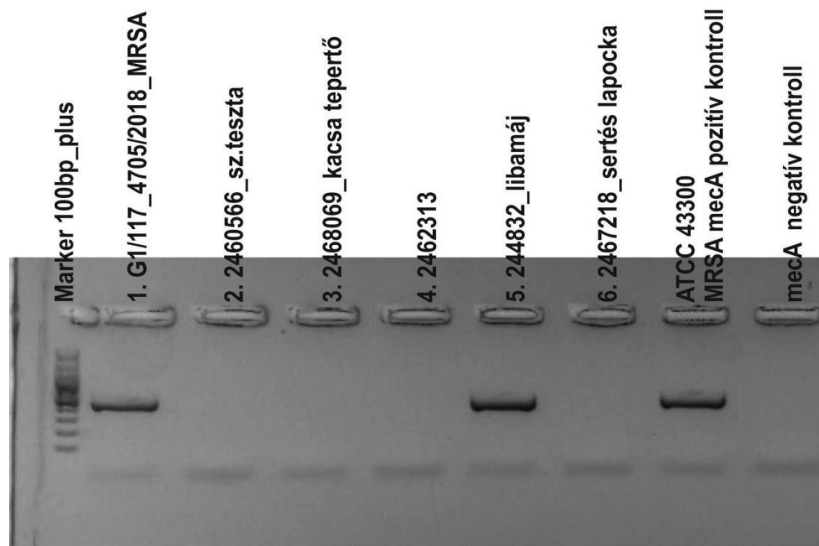
Az élelmiszerekből izolált *S. aureus* törzsek methicillin-rezisztenciájának meghatározása céljából, egy MRSA szelektív és differenciáló tápközegebe is átoltottam az izolátumokat. Minden törzset két ismételtsben vizsgáltam és a referencia MRSA és MSSA törzseket kontrollként alkalmaztam a vizsgálat során (2. kép). Az MRSA referencia törzsek és az élelmiszerekből izolált 47 törzs közül, a libamájból (SA-17) és a sertés tarjából (SA-47) izolált törzsek mályvaszínű telepeket képeztek a táptalajon, a referencia MSSA törzsek és a többi élelmiszerből izolált törzs esetében azonban nem volt megfigyelhető telep.



2. kép MRSA és MSSA referencia törzsek tenyésztése az MRSA CHROMagar szelektív, differenciáló táptalajon

3.2.6.4. A *mecA* gén tipizálás eredményei

Az MRSA szelektív, differenciáló táptalaj, a korongdiffúziós módszer és a MALDI-TOF MS vizsgálatok alapján kiderült, hogy az SA-17-es és az SA-47-es 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 SA-17 (3. kép) és a SA-47 törzsek esetében kimutattam a *mecA* génkomplexet.



3. kép A *mecA* génkomplex kimutatása a libamájból izolált SA-17-es *S. aureus* törzsben

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

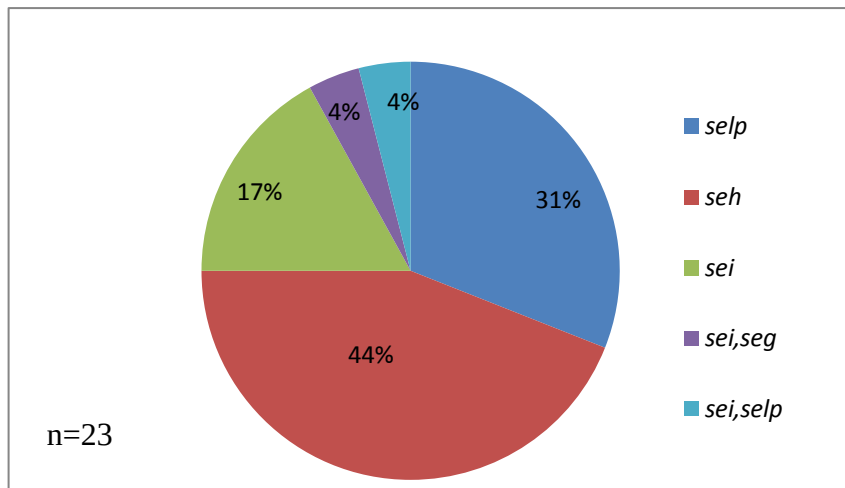
A multiplex PCR módszerrel elvégzett vizsgálat során a 47 élelmiszerből izolált *S. aureus* törzs közül 23 törzs esetében detektáltam SE géneket. Ezeknek a törzseknek a 91%-a csak egy SE gént hordozott, azonban 2 törzs esetében 2 gént is sikerült kimutatni (45. táblázat). A vizsgálat során 4 különböző SE gént detektáltam a törzsekben, a *selp*, *seh*, *sei* és *seg* géneket. A vizsgált élelmiszer kategóriák mindegyikében volt legalább egy olyan törzs, amelyben detektálható volt legalább egy SE gén.

Az enterotoxint termelő 23 törzs 44%-ában *seh* gén, 31%-ában a *selp* gén volt kimutatható (15. ábra). A *seh* géneket a száraztésztaíkból és a húsokból izolált törzsek közül detektáltam, a *selp* gének pedig kimutathatók voltak a tejtermékekből, húsokból és a zöldségekből izolált *S. aureus* törzsek némelyikében (43. táblázat). Az enterotoxint termelő törzsek 17%-a *sei* géneket hordozott, melyeket legfőképp baromfi húsokból izoláltam.

A libamájból izolált MRSA törzs (SA-17) esetében, a *sei* és a *selp* géneket detektáltam, valamint a csokoládéból izolált MSSA törzs (SA-45) hordozta a *seg* és *sei* géneket egyaránt.

45. táblázat: Az élelmiszerekből izolált *S. aureus* törzsekben detektált SE gének

Élelmiszer kategória	Azonosító	Élelmiszer megnevezése	Detektált SE gének
Tejtermék	SA-1	Trappista sajt	<i>selp</i>
	SA-10	Trappista sajt	<i>selp</i>
	SA-18	Tejes desszert	-
Száraztészta	SA-2	Száraztészta	<i>seh</i>
	SA-49	Száraztészta	<i>seh</i>
	SA-7	Száraztészta	-
	SA-21	Száraztészta	-
	SA-22	Száraztészta	-
	SA-11	Száraztészta	-
	SA-12	Csirkecomb	<i>sei</i>
Hús	SA-13	Csirkecomb	<i>sei</i>
	SA-16	Pácolt csirke	<i>sei</i>
	SA-44	Egész kacs	-
	SA-17	Libamáj	<i>sei, selp</i>
	SA-20	Kacsatál	<i>seh</i>
	SA-28	Kacs comb	<i>seh</i>
	SA-29	Kacs tepertő	-
	SA-4	Császárszalonna	-
	SA-31	Bacon	<i>seh</i>
	SA-5	Kolbász	<i>seh</i>
	SA-6	Karaj	<i>selp</i>
	SA-32	Karaj	-
	SA-25	Kolbász	<i>seh</i>
	SA-33	Karaj	<i>selp</i>
	SA-24	Lapocka	-
	SA-34	Karaj	<i>seh</i>
	SA-9	Lapocka	<i>seh</i>
	SA-35	Lapocka	-
	SA-36	Lapocka	<i>selp</i>
	SA-37	Lapocka	-
	SA-15	Tepertő	<i>selp</i>
	SA-38	Sütnivaló kolbász	-
	SA-02	Lapocka	-
	SA-01	Kolbász	-
	SA-39	Csülök	-
	SA-40	Csülök	-
	SA-41	Fej	<i>seh</i>
	SA-47	Tarja	-
	SA-3	Marhahús	-
	SA-8	Marhahús	-
	SA-48	Belsőség	-
Vadhús	SA-42	Nyúlhús	-
Készételek	SA-43	Hamburger hús	<i>sei</i>
	SA-50	Grill csirke	-
	SA-45	Csokoládé	<i>seg, sei</i>
Zöldségek	SA-46	Friss saláta mix	-
	SA-27	Sárgarépa pástétom	<i>selp</i>

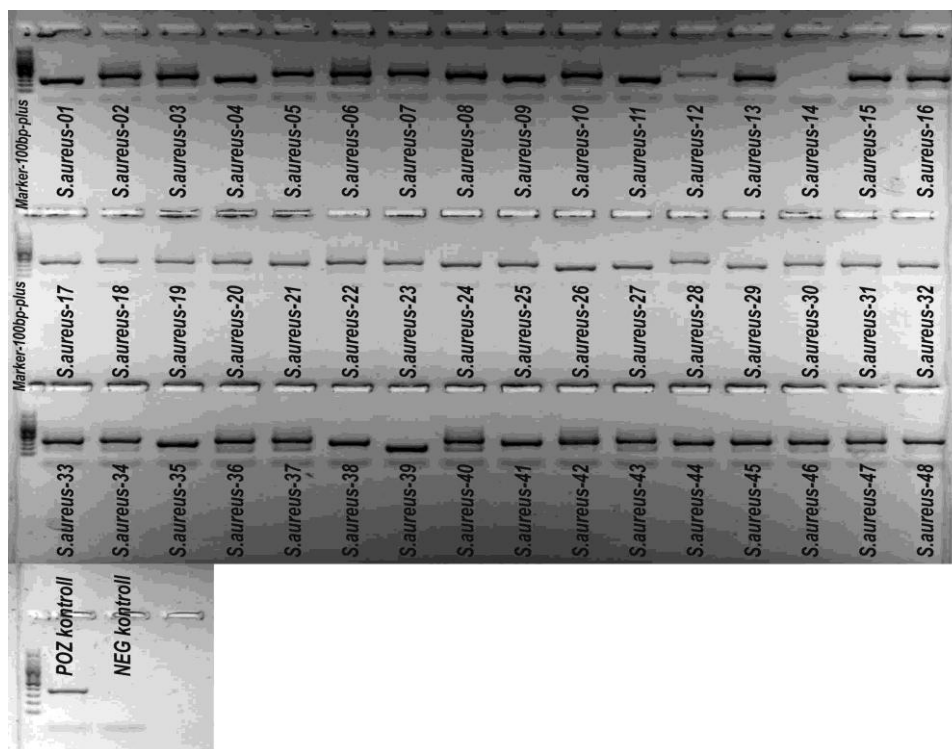


15. ábra Az SE gének megoszlása az enterotoxint termelő *S. aureus* törzsekben (n=23)

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

Két ismétlésben végeztem el az élelmiszerekből izolált 47 törzs *spa* tipizálását, pozitív kontrollként az ATCC 43300 referencia törzset alkalmaztam. A gélképen minden törzs esetében megjelent a *Staphylococcus* protein A-t kódoló gén terméke (4. kép).

Az élelmiszerekből izolált törzsek nagy variabilitást mutattak, mivel a tipizálás során a 47 izolátumban 20 különböző *spa* típust határoztam meg (46. táblázat). 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 (SA-25, SA-37) esetében, eddig még nem ismert ismétlődés kombinációt azonosítottam a szekvenciákban. A libamájból izolált MRSA törzs (SA-17) a t706 *spa* típusba, a sertés tarjából izolált MRSA törzs (SA-47) pedig a t011 *spa* típusba tartozott.



4. kép Az élelmiszerekből izolált *S. aureus* törzsek *spa* tipizálás során készített gélképe

A vizsgálat során elvégeztem a törzsek MLST tipizálását is, mely során a PubMLST honlapon (<https://pubmlst.org/saureus/>) elérhető adatbázisban szereplő adatokat használtam. A 20 azonosított *spa* típus közül, a szoftver 8 *spa* típus esetében tudta azonosítani a PubMLST adatbázisban meghatározott gént és az adott mintához hozzárendelni a szekvencia típust (46. táblázat). 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.

46. táblázat: Az élelmiszerekből izolált *S. aureus* törzsek *spa* és MLST típusa

Élelmiszer kategória	Azonosító	Élelmiszer megnevezése	spa típus	MLST típus	
Tejtermék	SA-1	Trappista sajt	t091	ST7	
	SA-10	Trappista sajt	t091	ST7	
	SA-18	Tejes desszert	t084	ST15	
Száraztészta	SA-2	Száraztészta	t127	ST1	
	SA-49	Száraztészta	t127	ST1	
	SA-7	Száraztészta	t084	ST15	
	SA-21	Száraztészta	t084	ST15	
	SA-22	Száraztészta	t084	ST15	
	SA-11	Száraztészta	t084	ST15	
	Baromfi	SA-12	Csirkecomb	t1491	ST1
SA-13		Csirkecomb	t002	ST5	
SA-16		Pácolt csirke	t3478	Ismeretlen	
SA-44		Egész kacs	t1491	ST1	
SA-17		Libamáj	t706	Ismeretlen	
SA-20		Kacsatál	t1491	ST1	
SA-28		Kacs comb	t1491	ST1	
SA-29		Kacs tepertő	t11807	Ismeretlen	
Hús		SA-4	Császár szalonna	t963	Ismeretlen
		SA-31	Bacon	t7673	Ismeretlen
	SA-5	Kolbász	t1491	ST1	
	SA-6	Karaj	t091	ST7	
	SA-32	Karaj	t011	ST398	
	SA-25	Kolbász	Ismeretlen	Ismeretlen	
	SA-33	Karaj	t213	ST12	
	SA-24	Lapocka	t213	ST12	
	SA-34	Karaj	t1778	ST1	
	Sertés	SA-9	Lapocka	t1778	ST1
		SA-35	Lapocka	t1451	Ismeretlen
		SA-36	Lapocka	t213	ST12
		SA-37	Lapocka	Ismeretlen	Ismeretlen
		SA-15	Tepertő	t091	ST7
		SA-38	Sütnivaló kolbász	t084	ST15
		SA-02	Lapocka	t15546	Ismeretlen
	SA-01	Kolbász	t189	Ismeretlen	
	SA-39	Csülök	t084	ST15	
	SA-40	Csülök	t084	ST15	
	SA-41	Fej	t10349	Ismeretlen	
SA-47	Tarja	t011	ST398		
Marha	SA-3	Marhahús	t091	ST7	
	SA-8	Marhahús	t330	Ismeretlen	
	SA-48	Belsőség	t084	ST15	
Vadhús	SA-42	Nyúlhús	t656	Ismeretlen	
Készételek	SA-43	Hamburger hús	t363	Ismeretlen	
	SA-50	Grill csirke	t1491	ST1	
	SA-45	Csokoládé	t330	Ismeretlen	
Zöldségek	SA-46	Friss saláta mix	t330	Ismeretlen	
	SA-27	Sárgarépa pástétom	t091	ST7	

A haszonállatokból izolált 13 törzs közül, a t011, t034 és t127 *spa* típusba 4-4 törzs, míg a t458 *spa* típusba 1 törzs tartozott (47. táblázat). Az 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* típushoz az ST97 szekvencia típus lett hozzárendelve.

47. táblázat: A haszonállatokból izolált *S. aureus* törzsek *spa* és MLST típusa

Azonosító	Faj	<i>spa</i> típus	MLST típus
127	sz.marha	t011	ST398
146	sz.marha	t011	ST398
297	ló	t011	ST398
136	sertés	t011	ST398
237	sz.marha	t034	ST398
034	sertés	t034	ST398
113	sertés	t034	ST398
126	sertés	t034	ST398
116	sz.marha	t127	ST1
121	sz.marha	t127	ST1
145	sz.marha	t127	ST1
329	ló	t127	ST1
065	sertés	t458	ST97

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

Az élelmiszerekből és haszonállatokból izolált törzsek (n=60) tömegspektrumaiban ST specifikus csúcsokat teszteltem és határoztam meg. A 48. táblázatban szereplő első 3 csúcsot korábbi tanulmányokban publikálták, a többi specifikus csúcsot a spektrumok elemzése során határoztam meg. Az MLST vizsgálat során, 7 különböző ST típust azonosítottam, 18 törzs esetében azonban a szoftver nem tudta azonosítani a PubMLST adatbázisban meghatározott gén szakaszhatárokat, ezáltal nem tudtam az adott mintához hozzárendelni a szekvencia típust és allél verziószámokat. Összesen 14 specifikus csúcsot határoztam meg, melyek lehetővé teszik a 7 különböző ST típus elkülönítését. Egy ST típusba több izolátum tartozott, ezért a megjelenő specifikus csúcsok előfordulási gyakoriságát tüntettem fel.

48. 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 vizsgálat során ST7 specifikus csúcsként a 4860 m/z, 4874 m/z és 6575 m/z csúcsokat detektáltam 100%-os előfordulási gyakorisággal. Az ST15 típusú törzsekben is 100%-os előfordulási gyakorisággal detektáltam a 4860 m/z és a 4874 m/z csúcsokat, azonban, ebben a típusban nem jelent meg a 6575 m/z csúcs.

Az ST1 típusú törzsek esetében detektáltam a legtöbb specifikus csúcsot, azonban csak a 3007 m/z csúcs jelent meg minden izolátumban (100%). Az általam meghatározott 8 ST1 specifikus csúcs közül, 2 csúcsot (3037 m/z, 6575 m/z) detektáltam 50%, vagy a feletti előfordulási gyakorisággal. Négy csúcsot (6453 m/z, 6498 m/z, 6536 m/z, 6630 m/z) mindössze 3 (21%) törzsben, 2 csúcsot (5598 m/z, 5653 m/z) pedig 5 (36%) törzsben detektáltam.

A vizsgált izolátumok közül csak 1 törzs tartozott az ST5 szekvencia típusba. A 3891 m/z csúcs csak ebben a típusban volt detektálható, a többi típus esetében nem jelent meg. A 6575 m/z csúcs ebben a típusban is megjelent. Az ST12 típusba 3 törzs tartozott, ebben a típusban csak egy specifikus csúcsot azonosítottam, az 5800 m/z csúcsot, amely a többi típus esetében nem volt detektálható. A 6575 m/z csúcs ezekben az izolátumokban is kimutatható volt. A 6180 m/z és a 7143 m/z csúcsokat csak az ST97 típusú törzsben detektáltam.

Az ST398 típusú törzsek esetében a korábbi tanulmányokban meghatározott specifikus csúcsok jelentek meg, az 5004 m/z csúcs a törzsek 13%-ában volt detektálható, a 4511 m/z csúcs azonban minden izolátumban megjelent (46. táblázat). Az általam meghatározott specifikus csúcsok közül csak a 6575 m/z csúcs jelent meg az izolátumokban, azonban ez a csúcs más ST típusokban is detektálható volt, tehát ST398 specifikus csúcsokat nem tudtam azonosítani a vizsgálat során (49. táblázat).

49. táblázat: A vizsgálat során meghatározott ST specifikus csúcsok összefoglaló táblázata

ST típus	Specifikus markerszettek (m/z)							
ST7	4860	4874	6575					
ST15	4860	4874						
ST1	3037	5598	5653	6453	6498	6536	6575	6630
ST5	3891	6575						
ST12	5800	6575						
ST97	6180	7143						
ST398	6575							

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. A legtöbb specifikus csúcs az ST1 típusú törzsek esetében jelent meg, azonban ezek közül egyik csúcsot sem tudtam 100%-os előfordulási gyakorisággal detektálni. A korábbi tanulmányokban meghatározott, 4511 m/z és 5004 m/z csúcs lehetővé teszi az állattenyésztésben leggyakrabban előforduló, 398-as szekvencia típusú törzsek gyors azonosítását. A MALDI-TOF MS technikával meghatározott markerszettek ezáltal elősegíthetik a *S. aureus* törzsek szekvencia típusainak elkülönítését, valamint az egyes szekvencia típusok meghatározását.

4. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

A jelenlegi mikrobiológiai gyakorlat elsősorban tenyésztési módszereken alapul, mely során a mikrobákat fenotípusos és biokémiai tulajdonságaikkal jellemezik, illetve a növekedésükhöz és az anyagcseréjükhöz szükséges szubsztrátok alapján azonosítják. Azonban egyes, morfológiailag és biokémiai tulajdonságaiban is hasonló mikroorganizmusok elkülönítése és azonosítása hosszadalmas eljárások sorozata valamint nagy szakmai tapasztalatot igényel. Ezért egy rutin mikrobiológiai laboratóriumban a mikroorganizmusok azonosítása céljából a MALDI-TOF MS technika egy egyszerűbb, gyorsabb, biztonságosabb és gazdasági szempontból is kedvezőbb eljárás, mint a szelektív differenciáló táptalajok alkalmazása.

A MALDI-TOF MS vizsgálatokat a minta-előkészítési módszerek és a tenyésztési körülmények tömegspektrumokra gyakorolt hatásainak összehasonlításával kezdtem el és ezen eredmények alapján választottam ki, valamint optimalizáltam a *Staphylococcus aureus* fajra leghatékonyabb eljárást. A kidolgozott M-FA minta-előkészítési módszer lehetővé tette a fajok biztonságos azonosítását és a spektrumok megfelelő intenzitásának és felbontásának köszönhetően a specifikus csúcsok (biomarkerek) elemzését. Továbbá, az M-FA minta-előkészítési módszer anyag és eszközigénye, valamint az eljáráshoz szükséges idő alapján, könnyen beilleszthető a rutin laboratóriumi diagnosztikába.

A „SAC” fajainak elkülönítését szolgáló biomarkerek elemzése során, előző tanulmányokban meghatározott 29 specifikus csúcsot teszteltem és 8 specifikus csúcsot határoztam meg a referencia törzsek tömegspektrumainak összehasonlítása alapján, majd ezeket a biomarkereket teszteltem az élelmiszerekből és haszonállatokból származó izolátumokon. A specifikus csúcsok meghatározását 1 db referencia *S. argenteus*, 1 db referencia *S. schweitzeri* és 7 db referencia *S. aureus* törzs tömegspektrumainak összehasonlításával végeztem el. A nyolc biomarker közül, hét a *S. argenteus* és *S. schweitzeri* fajokra volt specifikus, melyek közül egyik sem volt detektálható a vizsgálatba bevont izolátumok tömegspektrumaiban. A vizsgálat során, az előző tanulmányokban meghatározott 29 biomarker közül 8 csúcs eltérő fajban/fajokban jelent meg, ezért a biztonságos elkülönítés érdekében további referencia törzsek és izolátumok bevonása szükséges, továbbá szükség lenne valós környezetből izolált minták vizsgálatára is.

A methicillin-rezisztencia MALDI-TOF MS technikával történő azonosítása során is a korábbi tanulmányokban leírt specifikus csúcsok elemzésével kezdtem el a vizsgálatokat. A 10 tesztelt biomarker közül mindössze 3 csúcs tette lehetővé az MRSA és MSSA törzsek elkülönítést, azonban ezek sem minden esetben. A többi specifikus csúcs vagy egyik törzsben sem volt detektálható, vagy egyaránt megjelentek a MSSA és MRSA törzsekben is, ezért szükségessé vált további specifikus csúcsok meghatározása. A referencia MRSA és MSSA törzsek tömegspektrumainak összehasonlítása során 5 methicillin-rezisztencia specifikus csúcsot határoztam meg, azonban 2 csúcs a klinikai mintákból izolált MSSA törzsekben is megjelent.

A MALDI-TOF MS technikára kidolgozott minta-előkészítési eljárással, valamint a meghatározott specifikus csúcsok segítségével 2 törzs esetében állapítottam meg methicillin-rezisztenciát, melyet korongdiffúziós módszerrel, MRSA szelektív és differenciáló táptalajjal, valamint a *mecA* gén jelenlétével is igazoltam. Bár a módszert az elérhető valós mintákon is tesztelhettem, ezek számossága az alacsony incidencia miatt nem tekinthető kellőképpen specifikusnak. Emellett, az MRSA törzsek nagy variabilitása megnehezíti az általánosan alkalmazható methicillin-rezisztencia specifikus csúcsok meghatározását, ezért a biztonságos elkülönítés érdekében, ebben az esetben is további MRSA és MSSA izolátumok bevonására és tesztelésére lenne szükség.

Az élelmiszerekből izolált *S. aureus* törzsek enterotoxin vizsgálatát és szekvencia alapú tipizálását is elvégeztem, mely azt mutatta, hogy a 47 élelmiszerből izolált *S. aureus* törzs közül 23 törzs esetében 4 különböző SE gént (*selp*, *seh*, *sei*, *seg*) sikerült kimutatni. Az enterotoxint termelő, 23 törzs 44%-ában *seh* gén, 31%-ában a *selp* gén volt kimutatható, melyek járványügyi szempontból kevésbé relevánsak.

Az élelmiszerekből izolált 47 *S. aureus* törzs nagy variabilitást mutatott, hiszen 20 különböző *spa* típust határoztam meg, melyek közül mindössze 8 *spa* típus esetében tudtam hozzárendelni az MLST típust a szekvencia adatok alapján. Az élelmiszerekből izolált 2 MRSA törzs közül, az egyik izolátum az ST398 típusba tartozott, mely a leggyakoribb LA-MRSA típus. Azonban nem áll rendelkezésünkre olyan mennyiségű és minőségű vizsgálat, amiből biztosan megállapítható lenne Magyarországon az élelmiszerláncban leggyakrabban előforduló MRSA szekvencia típus. Továbbá a mezőgazdasági haszonállatoktól a forgalomba kerülő élelmiszerekig számos mód nyílik a kontaminációra, így az MLST típusokból legfeljebb csak következtetni tudunk a fertőző ágensre az adott szekvencia típus adaptációs képességét figyelembe véve. Feltehetően a sokkal diverzebb környezetnek és szennyező forrásnak tudható be, hogy

az állattenyésztési környezetből származó mintákban az *spa* és az ST típusok sokkal kevésbé voltak sokfélék, mivel összesen három-három ST és *spa* típus fordult elő az izolátumokban. Jelenleg, a teljes genom szekvenálás, a teljes genom MLST (wgMLST), a maggenom (cgMLST), vagy az SNP-k (egypontos nukleotid polimorfizmusok) vizsgálatai adhatnának választ azokra a kérdésekre, hogy több izolátumból milyen leszármazási viszonyok képezhetők le, azaz a fertőzés klonalitása felmérhető legyen. Járványos kitörésekben (orvosi, állatorvosi) vagy forrás-nyomonkövetés (source tracking) analízisekben ezeket a módszereket használják világszerte.

A vizsgálatba bevont élelmiszerekből és haszonállatokból származó izolátumokban összesen 7 különböző MLST típust tudtam meghatározni. A szekvencia típusok és a MALDI-TOF MS technikával kapott tömegspektrumok elemzésével markerszetteket határoztam meg, melyek lehetővé teszik egyes ST típusok elkülönítését. Korábbi tanulmányok eredményei alapján 3 ST specifikus csúcsot teszteltem és 14 csúcsot határoztam meg, melyek az adott ST típusra specifikusak, illetve több ST típusban, de különböző kombinációkban jelentek meg. Ennek köszönhetően, 7 ST típus elkülönítése, valamint az állattenyésztésben leggyakrabban előforduló ST398 típusú törzsek azonosítására nyílik lehetőség MALDI-TOF MS technikával. Azonban a *S. aureus* törzsek ST típusainak sokfélesége miatt, jelen esetben is további törzsek bevonására van szükség. A meghatározott specifikus csúcsok tesztelését eltérő, a dolgozatban nem szereplő ST típusba tartozó törzseken is szükséges elvégezni.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

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 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.

6. 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 hangyasavas szuszpendálás (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.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az antibiotikum rezisztens kórokozók közül a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) még mindig az egyik leggyakoribb oka a súlyos bakteriális fertőzéseknek, melyek 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. Dolgozatom céljából ezért az élelmiszerekben előforduló MRSA törzsek feltérképezését tűztam ki egy új diagnosztikai módszerrel, a MALDI-TOF MS technika segítségével, melyhez szükség volt egy új minta-előkészítési módszer kidolgozására. Továbbá, dolgozatomban célul tűztam ki, hogy az azonosított *S. aureus* törzsek összehasonlítását enterotoxin és szekvencia alapú tipizálás segítségével elvégezzem.

A kidolgozott módosított hangyasavas szuszpendálás (M-FA) minta-előkészítési módszer a MALDI-TOF MS spektrumok megfelelő intenzitásának és felbontásának köszönhetően lehetővé tette a fajok biztonságos azonosítását. Az M-FA módszerrel szignifikáns mértékben ($p < 0,05$) magasabb log score értékekkel azonosítottam az izolátumokat MALDI Biotíper 2.0 szoftver segítségével, mint direkt mintafelvitellel (DT) és hangyasavas direkt mintafelvitellel (DT-FA). Az M-FA és az EtOH extrakcióval kapott azonosítási log score értékek között nem volt szignifikáns különbség, azonban a kidolgozott eljárás anyag és eszközigénye, valamint az eljáráshoz szükséges idő alapján, könnyen beilleszthető a rutin laboratóriumi diagnosztikába.

MALDI-TOF MS technikával lehetőségem nyílt a *Staphylococcus aureus* komplex („SAC”) fajainak elkülönítésére. A korábbi tanulmányokban és az általam meghatározott faj specifikus csúcsok alapján, az élelmiszerekből és haszonállatokból izolált *S. aureus* törzsek között kizárható volt a *S. schweitzeri* és *S. argenteus* fajok jelenléte.

Az élelmiszerekből izolált *S. aureus* törzsek antibiotikum-rezisztenciáját elsősorban MALDI-TOF MS technikával határoztam meg, melyet korongdiffúziós módszerrel, szelektív differenciáló tápközzeggel valamint a *mecA* gén meghatározásával erősítettem meg. A MALDI-TOF MS technikával történő antibiotikum rezisztencia vizsgálat során is, korábbi tanulmányokban meghatározott specifikus csúcsokat teszteltem elsősorban, majd a referencia MRSA és MSSA törzsek tömegspektrumainak összehasonlítása alapján 3 specifikus csúcsot határoztam meg melyek lehetővé teszik az elkülönítést. A vizsgálatok alapján, az élelmiszerekből izolált *S. aureus* törzsek közül 2 törzs esetében

állapítottam meg methicillin-rezisztenciát, mind a két törzs állati eredetű élelmiszerekből származott.

Az élelmiszerekből izolált 47 *S. aureus* törzs enterotoxin vizsgálata során 23 törzs esetében 4 különböző SE gént (*selp*, *seh*, *seg*, *sei*) azonosítottam és a törzsek 91%-a csak egy SE gént hordozott. A leggyakoribb SE gén, a *seh* gén volt, mely a törzsek 44%-ában volt kimutatható, ezt követte a *selp* gén, melyet a törzsek 31%-a esetén határoztam meg. A két MRSA törzs közül csak a libamájból izolált MRSA törzs hordozott SE géneket (*sei* és *selp*).

A szekvencia alapú vizsgálatok alapján az élelmiszerekből izolált *S. aureus* törzsek közül többféle típusát sikerült kimutatni, a 47 izolátum 20 különböző *spa* típusba tartozott. A leggyakoribb a t084 *spa* típus volt (19%), ezt követte a t091 (13%) és t1491 (13%) *spa* típus. A 20 azonosított *spa* típus közül, 8 *spa* típus esetében tudtam meghatározni az MLST típust az allélvariánsok alapján, a többi 14 *spa* típus eddig le nem írt MLST típusba tartozott. Az élelmiszerekből izolált egyik MRSA törzs a 398 szekvencia típusba tartozott, ami Európában a leggyakrabban előforduló állattenyésztéssel összefüggő MRSA típus. A szekvencia típusok és a MALDI-TOF MS technikával kapott tömegspektrumok elemzésével olyan markerszetteket határoztam meg, melyek lehetővé tették a vizsgálatba bevont élelmiszerekből és haszonállatokból származó 7 ST típus elkülönítését.

8. SUMMARY

Among the antibiotic resistant microbes, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the major causative agents of severe bacterial infections, not only in healthcare (HA-MRSA), or communities (CA-MRSA), but also in livestock (LA-MRSA) and thus may be transferred to foodstuffs of animal origin. The aim of this study is thus to survey the incidence of MRSA in foodstuffs with a novel technique – MALDI-TOF mass spectrometry – along with the development of a sample-preparation technique. Furthermore, my aim was to include enterotoxin and sequence based typing of the identified *S. aureus* strain.

The novel M-FA sample preparation technique optimised the intensity and the resolution of the MALDI-TOF MS spectra and provided reliability in the microbial identification. The successful identification with Biotyper 2.0 software at a strain level was significantly ($p < 0.05$) higher when using the modified formic acid suspension (M-FA) method, than the direct transfer preparation (DT) or the direct transfer with formic acid (DT-FA) method. There was no significant difference between the identification success of the M-FA and the ethanol extraction method, however the turnaround-time and the cost benefits of using the M-FA method make it more easy to apply in routine laboratory diagnostics.

With the MALDI-TOF MS technique the members of the *Staphylococcus aureus* complex („SAC”) members could be distinguished from each other. Based on literature and new diagnostic peaks, we could conclude that *S. schweitzeri* and *S. argenteus* were not identified among bacterial strains of food origin.

The antibiotic resistance of the *S. aureus* strains of food origin was tested with MALDI-TOF MS technique, which was supplemented with antibiotic disk diffusion test, culturing on selective differential media and *mecA* gene PCR testing. When testing with MALDI-TOF MS for resistance, specific peak markers were screened from previous literature and following the analysis of spectra of MRSA and MSSA reference strains from our investigations, three additional, specific MALDI-TOF MS peak markers were identified that allowed the discrimination. There were 2 strains identified as MRSA from our strain collection of *S. aureus* isolates from foodstuffs of animal origin.

Among 47 *S. aureus* strains isolated from food, 23 strains 4 different SE genes (*seI*, *seH*, *seG*, *seI*) were identified, and only one SE gene was detected in 91% of the strains.

The most common SE gene was the *seh* gene, which was detected in 44% of the strains, followed by the *selp* gene, which was determined in 31% of the strains. Among two MRSA strains, two different types of SE genes (*sei*, *selp*) were detected only in a strain isolated from a goose liver.

Based on the results of sequence-typing, several types of *S. aureus* strains were isolated from food: 20 different *spa* types were identified among the 47 isolates. The most common *spa* type was the t084 (19%), followed by t091 (13%) and t1491 (13%). MLST types could be determined for 8 *spa* types, the remaining 14 *spa* types belonged to no-yet-described MLST types. One of the MRSA strains isolated from food belonged to the 398 sequence type, which is the most common livestock associated MRSA type in Europe. Based on the sequence types and the analysis of mass spectra obtained by MALDI-TOF MS technique, sets of peak markers were determined, which allowed for the discrimination of 7 different sequence types of *S. aureus* strains isolated food and livestock samples.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. AARESTRUP, F. M. – CAVACO, L. – HASMAN, H. (2010): Decreased susceptibility to zinc chloride is associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 in Danish swine. *Veterinary Microbiology*. 142, 455–457.
2. AARESTRUP, F. M. – LARSEN, H. D. – ERIKSEN, N. – ELSBERG, C.S. – JENSEN, N. E. (1999): Frequency of α - and β -haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*. 107, 425–430.
3. AGERSØ, Y. – HASMAN, H. – CAVACO, L. M. – PEDERSEN, K. – AARESTRUP, F. M. (2012): Study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Danish pigs at slaughter and in imported retail meat reveals a novel MRSA type in slaughter pigs. *Veterinary Microbiology*. 157 (1–2), 246–250.
4. AGHAMALIA, M. – RAHBARB, M. – KAFILC, H. S. – ESMAILKHANIA, A. – BIALVAEID, Z. (2017): Laboratory methods for identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Reviews in Medical Microbiology*. 28, 140–151.
5. AIRES-DE-SOUSA, M. (2016): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. *Clinical Microbiology and Infection*. 23, 373–380.
6. ÁLLAMI NÉPEGÉSZSÉGÜGYI ÉS TISZTIORVOSI SZOLGÁLAT-ANTSZ (2018): Nemzeti Nosocomialis Surveillance Rendszer 2018. évi eredményeiről.
7. ANJUM, M. F. - MARCO-JIMENEZ, F. - DUNCAN, D. - MARÍN, C. - SMITH, R. P. – EVANS, S. J. (2019): Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* From Animals and Animal Products in the UK. *Frontiers in Microbiology*. 10, 2136
8. ANONYMUS (2013). Livestock-associated MRSA found at a farm in East Anglia. London: GOV.UK.
9. ANONYMUS (2017). Antimicrobial resistance update: LA-MRSA. *Veterinary Record*. 181, 340–348.
10. AQIB, A. - ANJUM, I. M. - MALIK, A. A. - MEHMOOD, M. A. R. - FAROOQI, K. - HUSSAIN, S. H. K. (2017): Antibiotic susceptibilities and prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from bovine milk in Pakistan. *Acta Tropica*. 176. pp. 168–172

11. ARGUDÍN, M. A. – TENHAGEN, B. A. – FETSCH, A. – SACHSENRODER, J. – KÄSBOHRER, A. (2011): Virulence and resistance determinants of German *Staphylococcus aureus* ST398 isolates from nonhuman sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 77 (9), 3052–3060.
12. ARGUDÍN, M. Á. - MENDOZA, M. C. - RODICIO, M. R. (2010): Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*. 2 (7), 1751–1773.
13. ARMAND-LEFEVRE, L. – RUIMY, R. – ANDREMONT, A. (2005): Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. *Emerging Infectious Diseases*. 11 (5), 711–714.
14. ARVIDSON, S. (2006): Extracellular Enzymes. *Gram-Positive Pathogens*. ASM Press, Washington, D.C. Second Edition. 478–482.
15. ATEBA, N. U. – SCHAUMBURG, F. – ADEGNIKA, A. A. – KOSTERS, K. – OLLER, T. – FERNANDES, J. F. (2012): Epidemiology and population structure of *Staphylococcus aureus* in various population groups from a rural and semi urban area in Gabon, Central Africa. *Acta Tropica*. 124, 42–49.
16. ATYAH, M. A. - ZAMRI-SAAD, M. - SITI-ZAHRAH, A. (2010): First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from cage-cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary Microbiology*. 144 (3–4), 502–504.
17. AYLIFFE, G. A. J. (1997): The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infection Diseases*. 24, 74–79.
18. BABA, T. – TAKEUCHI, F. – KURODA, M. – YUZAWA, H. – AOKI, K. I. – OGUCHI, A. – NAGAI, Y. – IWAMA, N. – ASANO, K. – NAIMI, T. – KURODA, H. – CUI, L. – YAMAMOTO, K. – HIRAMATSU, K. (2002) Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*. 359,1819–1827.
19. BANNERMAN, T. L. – HANCOCK, G. A. – TENOVER, F. C. – MILLER, J. M. (1995): Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 33, 551–555.
20. BARBER, M. (1961): Methicillin-resistant staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*. 4, 385–393.
21. BECKER, S. - FRANKEL, M. B. - SCHNEEWIND, O. - MISSIAKAS, D. (2014): Release of protein A from the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111 (4), 1574–1579.

22. BEDNORZ, C. - OELGESCHLÄGER, K. - KINNEMANN, B. - HARTMANN, S. - NEUMANN, K. - PIEPER, R. - BETHE, A. - SEMMLER, T. - TEDIN, K. - SCHIERACK, P. - WIELER, L. H. - GUENTHER, S. (2013): The broader context of antibiotic resistance: zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. *International Journal of Medical Microbiology*. 303, 396-403.
23. BELÁK, Á. – KISKÓ, G. – KOVÁCS, M. – MARÁZ, A. - MOHÁCSINÉ FARKAS, CS. – POMÁZI, A. (2011): Gyors és molekuláris biológiai módszerek alkalmazása élelmiszerek mikrobiológiai vizsgálatára - Gyakorlati kézikönyv. 2. ÉLELMISZER-BIZTONSÁGI SZEMPONTBÓL JELENTŐS MIKROBÁK KIMUTATÁSA ÉS SZELEKTÁLÁSA fejezet. *Nemzeti Tankönyvkiadó*.
24. BENNETT, S. D. - WALSH, K.A. - GOULD, L. H. (2013): Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*--United States, 1998-2008. *Clinical Infectious Diseases*, 57, 425–433.
25. BERGER-BÄCHI, B. – ROHRER, S. (2002): Factors influencing methicillin-resistance in staphylococci. *Archives of Microbiology*. 178, 165–171.
26. BERGER-BÄCHI, B. (1994): Expression of resistance to methicillin. *Trends in Microbiology*. 2, 389–393.
27. BERNIER-LACHANCE, J. - ARSENAULT, J. - USONGO, V. – PARENT, É. - LABRIE, J. - JACQUES, M. - MALOUIN, F. – ARCHAMBAULT, M. (2020): Prevalence and characteristics of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) isolated from chicken meat in the province of Quebec, Canada. *Plos One*. 15 (1), 1-19.
28. BERUBE, B.J. - WARDENBURG J. B. (2013): *Staphylococcus aureus* α -toxin: Nearly a century of intrigue. *Toxins*. 5, 1140–1166.
29. BONDI, A. – DIETZ, C. C. (1945): Penicillin resistant staphylococci. *Experimental Biology and Medicine*. 60, 55–58.
30. BOSCH, T. – VERKADE, E. - VAN LUIT, M. – LANDMAN, F. – KLUYTMANS, J. – SCHOULS, L. M. (2015): Transmission and persistence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians and their household members. *Applied and Environmental Microbiology*. 81 (1), 124-129.
31. BOUTIBA-BEN, B. - BEN ABBES, H. - BEN ABDALLAH, K. - MAMLOUK, F. - MAHJOUBI, A. - KAMMOUN, A. - HAMMAMI, S. – BEN, R. (2004):

- Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the routine detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*.10, 762-765.
32. BOYE, K. – BARTELS, M. D. – ANDERSEN, I. S. – MØLLER, J. A. – WESTH, H.(2007): A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec types I–V. *Clinical Microbiology and Infection*. 13, 725–727.
 33. BÖRÖCZ, K. (2001): A magyarországi nosocomialis MRSA járványok tapasztalatai (1993-2000). *Epidemiológiai Információs Hetilap*. 8. (10-11).
 34. BÖRÖCZ, K. (2005): Az Országos tisztifőorvos állásfoglalása a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) törzsek által okozott, egészségügyi ellátással összefüggő fertőzések megelőzésükről és terjedésük megakadályozásáról. *Epidemiológiai Információs Hetilap*. 12. (5).
 35. BRUKER DALTONIK GMBH (2013a): SOP - Ethanol Extraction (EX) Method, Rev.3 (August, 2013).
 36. BRUKER DALTONIK GMBH (2013b): SOP - Direct Transfer (DT) Method, Rev.3 (August, 2013).
 37. BRUKER DALTONIK GMBH (2013c): SOP - Instructions for Use Sinapinic Acid (SA). Purified matrix substance for matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometers (MALDI-TOF MS).
 38. BRUKER DALTONIK GMBH (2013d): SOP - Instructions for Use Bruker Matrix HCCA, portioned Purified matrix substance for matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS).
 39. BRUKER DALTONIK GMBH (2013e): SOP - Instructions for Use 2,5-Dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB) Purified matrix substance for matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometers (MALDI-TOF MS).
 40. BRUKER DALTONIK GMBH (2015): SOP - Instructions for Use Bruker Guide to MALDI Sample Preparation.
 41. BUKOWSKI, M. – WLADYKA, B. – DUBIN, G. (2010): Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins*. 2, 1148–1165.
 42. CARLSSON, R. – FISCHER, H. – SJÖGREN, H. O. (1988). Binding of staphylococcal enterotoxin A to accessory cells is a requirement for its ability to activate human T cells. *Journal of Immunology*. 140, 2484–2488.

43. 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.
44. CASSINI, A. – HÖGBERG, L. D. – PLACHOURAS, D. – QUATTROCCHI, A. – HOXHA, A. – SIMONSEN, G. S. (2019): Attributable deaths and disability-adjusted lifeyears caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 19 (1), 56-66.
45. CAVACO, L. M. - HASMAN, H. - STEGGER, M. - ANDERSEN, P. S. - SKOV, R. -FLUIT, A.C. – ITO, T. - AARESTRUP, F. M. (2010): Cloning and occurrence of *czrC*, a gene conferring cadmium and zinc resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 isolates. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*. 3605-3608.
46. CAVACO, L.M. – HASMAN, H. – AARESTRUP, F. M. (2011): Zinc resistance of *Staphylococcus aureus* of animal origin is strongly associated with methicillin-resistance. *Veterinary Microbiology*. 150, 344–348.
47. CHANTRATITA, N. – WIKRAIPHAT, C. – TANDHAVANANT, S. (2016): Comparison of community-onset *Staphylococcus argenteus* and *Staphylococcus aureus* sepsis in Thailand: a prospective multicentre observational study. *Clinical Microbiology and Infection*. 22 (5), 458.
48. CHARYULU, M. E. - GNANAMANI, A. – MANDAL, A. B. (2012): Identification and Discrimination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Strains Isolated From Burn Wound Sites Using PCR and Authentication With MALDI-TOF-MS. *Indian Journal of Microbiology*. 52(3), 337–345.
49. CHEN, S. Y. - LEE, H. – WANG, X-M. – LEE, T-F. – LIAO, C-H. – TENG, L-J. – HSUEH, P-R. (2018): High Mortality Impact of *Staphylococcus Argenteus* on Patients With Community-Onset Staphylococcal Bacteraemia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 52 (6), 747-753.
50. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI (2019): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eighteenth Informational Supplement M100- S18. Wayne, PA, USA: CLSI.

51. COLAKOGLU, S. – ALISKAN, H. – SENGHER, S. S. – TURUNC, T. – DEMIROGLU, Y. Z. – ARSLAN, H. (2007): Performance of MRSA ID chromogenic medium for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from blood cultures and clinical specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 59, 319–323.
52. CREATIVE PROTEOMICS (2020): MALDI-TOF Mass Spectrometry. <https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm>
letöltés dátuma: 2020.07.31.
53. CRIBIER, B. (1994): Leukocidin from *Staphylococcus aureus* and Cutaneous Infections: An Epidemiologic Study. *Archives in Dermatology*. 130, 1208–1209.
54. CUNY, C. - FRIEDRICH, A. - KOZYTSKA, S. - LAYER, F. - NUBEL, U. - OHLSSEN, K. - STROMMENDER, B. - WALTHER, B. - WIELER, L. - WITTE, W. (2010). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *International Journal Medical Microbiology*. 300, 109–117.
55. DE BOER, E. - ZWARTKRUIS-NAHUIS, J. T. – WIT, B. – HUIJSDENS, X. W. - NEELING, A. J. (2009): Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *International Journal of Food Microbiology*. 134 (1–2), 52–56.
56. DÉSI, I. (2013): A húst szennyező baktériumok kimutatása. Húsok és húskészítmények mikrobiológiai vizsgálata. Élelmezés Higiéne. *Egészségtudomány*. 57 (1) 1-10.
57. DEVRIESE, L. A. (1984): A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal species. *Journal of Applied Bacteriology*. 56, 215–220.
58. DEVRIESE, L. A. - VAN DAMME, L. R. – FAMEREE, L. (1972): Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zentralbl. Veterinarmed.* 19, 598–605.
59. DEVRIESE, L. A. - VANCANNEYT, M. - BAELE, M. - VANEECHOUTTE, M. - DE GRAEF, E. - SNAUWAERT, C. - CLEENWERCK, I. - DAWYNDT, P. - SWINGS, J. - DECOSTERE, A. – HAESEBROUCK, F. (2005): *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55, 1569-1573.

60. DINGES, M. M. – ORWIN, P.M. – SCHLIEVERT, P.M. (2000): Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*. 13, 16–34.
61. DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN – DSM (2020): <https://lpsn.dsmz.de/family/micrococcaceae>
62. DUARTE, C. O. - LENCASTRE, H. (2011): Methicillin-Resistance in *Staphylococcus aureus* Is Not Affected by the Overexpression in Trans of the *mecA* Gene Repressor: A Surprising Observation. *PLOS*. 6 (8), 23287.
63. DWEBBA, C. C. - ZISHIRI, O. T. – ZOWALATY, M. E. (2018): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: livestock-associated, antimicrobial, and heavy metal resistance. *Infection and Drug Resistance*. 11, 2497–2509.
64. EDWARDS-JONES, V. – CLAYDON, M. A. – EVASON, D. J. – WALKER, J. – FOX, A. J. – GORDON, D. G. (2000): Rapid Discrimination Between Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* by Intact Cell Mass Spectrometry. *Journal of Medical Microbiology*. 49 (3), 295-300.
65. ENRIGHT, M. C. - DAY, N. P. J. - DAVIES, C. E. - PEACOCK, S. J. – SPRATT, B. G. (2000): Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 38 (3), 1008–1015.
66. ERMENLIEVA, N. M. – TODOROVA, T. T. – TSANKOVA, G. S. – POPOVA, T. K. – GEORGIEVA, E. P. (2016): Effectiveness of MRSA detection methods in the laboratory practice – a brief review. *Journal of IMAB*. 22, 1157–1159.
67. EURÓPAI BIZOTTSÁG (2017): Az állatgyógyászati készítmények neveinek, gyógyszerformáinak, hatáserősségeinek, az állatfajoknak, az alkalmazás módjainak és az egyes tagállamokban a kérelmezők és a forgalombahozatali engedély jogosultjainak felsorolása. https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170626136754/anx_136754_hu.pdf letöltés dátuma: 2020.07.15.
68. EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK BIZOTTSÁG 2073/2005/EK RENDELETE (2005. november 15.) az élelmiszerek mikrobiológiai kritériumairól.
69. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASES PREVENTION AND CONTROL- ECDC (2019): Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. *Surveillance report*.
70. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA (2009a): Assessment of the Public Health significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods.

71. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA (2009): Joint scientific report of ECDC, EFSA and EMEA on meticillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in livestock, companion animals and food. Summary of the scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards (EFSA/BIOHAZ) on “Assessment of the Public Health significance of meticillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods” and the Reflection paper of the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (EMA/CVMP) on “MRSA in food producing and companion animals and in the European Union: Epidemiology and control options for human and animal health”.
72. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*. 15, 5077.
73. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA (2018): The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA journal*. 16 (2), 5182.
74. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA (2019): The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal*. 17 (12), 5926.
75. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA (2020): Foodborne Zoonotic Diseases. *Scientific Topics*. <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/foodborne-zoonotic-diseases>
76. EUROPEAN MEDICINES AGENCY – EMA (2016): Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2016. Trends from 2010 to 2016 Eighth ESVAC report. *Veterinary Medicines Division*.
77. EUROPEAN MEDICINES AGENCY – EMA (2017): Questions and answers on veterinary medicinal products containing zinc oxide to be administered orally to food-producing species. (EMA/V/A/118). *Veterinary Medicines Division*.
78. FEIL, E. J. – MAIDEN, M. C. – ACHTMAN, M. – SPRATT, B. G. (1999): The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. *Molecular Biology and Evolution*. 16 (11), 1496-502.
79. FERRONI, A. - SUAREZ, S. - BERETTI, J. L. - DAUPHIN, B. - BILLE, E. - MEYER, J. - BOUGNOUX, M. E. - ALANIO, A. (2010): Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 48, 1542–1548.

80. FISHER, E. L. - OTTO, M. - CHEUNG, G. Y. C. (2018). Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning. *Frontiers in Microbiology*. 9, 436.
81. FISHOVITZ, F. - JUAN, A. - HERMOSO, M. C. - SHAHRIAR, M. (2014): Penicillin-Binding Protein 2a of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *National Institutes of Health*. 66 (8), 572-577.
82. FLORES-DÍAZ, M. - MONTURIOL-GROSS, L. – NAYLOR, C. - ALAPE-GIRÓN, A. – FLIEGER, A. (2016): Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as Virulence Factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80, 597–628.
83. FLUIT, A.C. (2012): Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*. 18 (8), 735-744.
84. FRENEY, J. - KLOOS, W. E. - HAJEK, V. – WEBSTER, J. A. (1999): Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 49, 489-502.
85. FROST, L. S. – LEPLAE, R. – SUMMERS, A.O. – TOUSSAINT, A. (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*. 3, 722–732.
86. GIEBEL, R. - WORDEN, C. - RUST, S. M. - KLEINHEINZ, G. T. - ROBBINS, M. -SANDRIN, T. R. (2010): Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Advances in Applied Microbiology*. 71, 149–184.
87. GIEBEL, R. A. - FREDENBERG, W. - SANDRIN, T. R. (2008): Characterization of environmental isolates of *Enterococcus* spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Water Research*. 42, 931–940.
88. GOUDARZI, M. - FAZELI, M. - GOUDARZI, H. - AZAD, M. - SEYEDJAVADI, S. S. (2016). *Spa* typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical specimens of patients with nosocomial infections in Tehran, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 9, 35685.
89. GOULD, I. M. – DAVID, M. Z. – ESPOSITO, S. – GARAU, J. – LINA, G. (2012): New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

- pathogenesis, treatment and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 39, 96–104.
90. GRUMANN, D. – NÜBEL, U. – BRÖKER, B. M. (2014): *Staphylococcus aureus* toxins - Their functions and genetics. *Infection, Genetics and Evolution*. 21, 583–592.
 91. GRUMANN, D. – RUOTSALAINEN, E. – KOLATA, J. – KUUSELA, P. – JÄRVINEN, A. – KONTINEN, V. P. – BRÖKER, B. M. – HOLTFRETER, S. (2011): Characterization of infecting strains and superantigen-neutralizing antibodies in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical and Vaccine Immunology*. 18, 487–493.
 92. GRUNDMANN, H. - AANENSEN, D. M. - VAN DEN WIJNGAARD, C. C. - SPRATT, B. G. - HARMSSEN, D. - FRIEDRICH, A. W. (2010). Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Medicine*. 7, e1000215.
 93. HACKER, J. – KAPER, J. B. (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Review of Microbiology*. 54, 641–679.
 94. HALLIN, M. – DEPLANO, A. – DENIS, O. - DE MENDONÇA, R. - DE RYCK, R. – STRUELENS, M. J. (2007): Validation of pulsed-field gel electrophoresis and *spa* typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 45 (1), 127-133.
 95. HAMMAD, A. M. – WATANABE, W. – FUJII, T. – SHIMAMOTO, T. (2012): Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish. *International Journal of Food Microbiology*. 156 (3), 286–289.
 96. HARMSSEN, D. – CLAUS, H. – WITTE, W. – ROTHGÄNGER, J. – CLAUS, H. – TURNWALD, D. – VOGEL, U. (2003): Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (12), 5442-5448.
 97. HARTLEY, H. – WATSON, C. – NUGENT, P. – BEGGS, N. – DICKSON, E. – KEARNS, A. (2014). Confirmation of LA-MRSA in pigs in the UK. *Veterinary Record*. 175, 74–75.

98. HEALTH FOR ANIMALS – GLOBAL ANIMAL HEALTH ASSOCIATION (2020): Global challenges, zoonoses. <https://healthforanimals.org/zoonoses.html>
letöltés dátuma: 2020. 07. 20.
99. HENNEKINNE, J. A. - DE BUYSER, M. L. - DRAGACCI, S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*. 36, 815–836.
100. HOLLEN, K. (2016): A novel and rapid *Staphylococcus aureus* bacterial identification method utilizing immunomagnetic beads and single cell laser-light scattering. Doctoral thesis. Northern Michigan University. USA.
101. HOLT, D. C. – HOLDEN, M. T. – TONG, S. Y. (2011): A very early-branching *Staphylococcus aureus* lineage lacking the carotenoid pigment staphyloxanthin. *Genome Biology and Evolution*. 3, 881–895.
102. INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE CLASSIFICATION OF STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME ELEMENTS - IWG-SCC (2009): Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for Reporting Novel SCC*mec* Elements. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53(12), 4961–4967.
103. JACKSON, K. A. - EDWARDS-JONES, V. - SUTTON, C. W. - FOX, A. J. (2005) Optimisation of intact cell MALDI method for fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* . *Journal of Microbiological Methods*. 62, 273–284.
104. JENSEN, S. O. – LYON, B. R. (2009): Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology*. 4, 565–582.
105. JEVONS, M. P. (1961): “Celbenin”-resistant staphylococci. *British Medical Journal*. 1, 124–125.
106. JOHNSON, A. P. (2011): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the European landscape. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 66, 43-48.
107. 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* Harboring the Class A Mec Complex by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *International Journal of Medical Microbiology*. 304 (8), 1018-1023.
108. 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.
109. JUHÁSZ-KASZANYITZKY, E. – JÁNOSI, S. – SOMOGYI, P. – DÁN, A. - VAN DER, A. - GRAAF-VAN BLOOIS, L. (2007): MRSA transmission between cows and humans. *Emerging Infectious Diseases*. 13 (4), 630–632.
110. JUNG-MIN, K. – INHEE, K. - CHUNG, S. H. - CHUNG, Y. - HAN, M. - JAE-SEOK, K. (2019): Rapid Discrimination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by MALDI-TOF MS. *Pathogens*. 8 (4), 214. 1-11.
111. JUNGWHAN, C. - KIDON, S. - SAEED, K. (2017): Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Food-Producing and Companion Animals and Food Products. *Frontiers in Staphylococcus aureus. Intechopen*.
112. KATAYAMA, Y. – BABA, T. – SEKINE, M. – FUKUDA, M. – HIRAMATSU, K. (2013): Beta-hemolysin promotes skin colonization by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 195, 1194–1203.
113. KELMAN, A. – SOONG, Y. A. – DUPUY, N. – SHAFER, D. – RICHBOURG, W. – JOHNSON, K. (2011): Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* from retail ground meats. *Journal of Food Protection*. 74 (10), 1625–1629.
114. KÉROUANTON, A. - HENNEKINNE, J. A. - LETERTRE, C. - PETIT, L. - CHESNEAU, O. - BRISABOIS, A. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology*. 115, 369–375.
115. KIRBY, W. M. (1944): Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science*. 99, 452–453.
116. KOREEN, L. – RAMASWAMY, S. V. – GRAVISS, E. A. – NAIDICH, S. – MUSSER, J. M. – KREISWIRTH, B. N. (2004): *spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *Journal of Clinical Microbiology*. 42 (2), 792-799.
117. KOS, V. N. – DESJARDINS, C. A. – GRIGGS, A. – CERQUEIRA, G. - VAN TONDER, A. (2012): Comparative genomics of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their positions within the clade most

- commonly associated with methicillin-resistant *S. aureus* hospital-acquired infection in the United States. *mBio*. 3, 00112-12.
118. KÖCK, R. - HARLIZIUS, J. - BRESSAN, N. - LAERBERG, R. - WIELER, L. H. - WITTE, W. - DEURENBERG, R. H. - VOSS, A. - BECKER, K. – FRIEDRICH, A. W. (2009): Prevalence and Molecular Characteristics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) Among Pigs on German Farms and Import of Livestock-Related MRSA Into Hospitals. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 28 (11), 1375-1382.
 119. KÖCK, R. – BECKER, K. – COOKSON, B. (2010): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *EuroSurveillance*. 15 (41), 19688.
 120. KUIPERS, A. - STAPELS, D. A. C. - WEERWIND, L. T. - KO, Y. - RUYKEN, Y. - LEE, J. C. - VAN KESSEL, K. P. M. - ROOIJAKKERS, S. H. M. (2016): The *Staphylococcus aureus* polysaccharide capsule and Efb-dependent fibrinogen shield act in concert to protect against phagocytosis. *Microbiology*. 162 (7), 1185-1194.
 121. KWON, S. S. - HONG, S. K. - SOOK KIM, M. - YONG, D. – LEE, K. (2017): Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Fight Mass Spectrometry for Rapid Discrimination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): First Report of a Relation Between Protein Peaks and MRSA *spa* Type. *Annals of Laboratory Medicine*. 37 (6), 553–555.
 122. KYOUNG-SOON, J. - YOUNG HWAN, K. (2018): Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. *Journal of Microbiology*. 56 (4), 209–216.
 123. LA SCOLA, B. (2011): Intact cell MALDI-TOF mass spectrometry-based approaches for the diagnosis of bloodstream infections. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 11, 287–298.
 124. LADHANI, S. (2001): Recent developments in staphylococcal scalded skin syndrome. *Clinical Microbiology and Infection*. 7, 301–307.
 125. LE LOIR, Y. – BARON, F. – GAUTIER, M. (2003): *Staphylococcus aureus* and Food Poisoning. *Genetics and Molecular Research*. 2, 63–76.
 126. LEE, C.Y. – SCHMIDT, J. J. - JOHNSON-WINEGAR, A. D. - SPERO, L. – IANDOLO, J. J. (1987): Sequence determination and comparison of the exfoliative

- toxin A and toxin B genes from *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*. 169, 3904–3909.
127. LIM, D. - STRYNADKA, N. C. J. (2002): Structural basis for the β -lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Structural Biology*. 9 (11), 870-876.
 128. LINDSAY, J. – HOLDEN, M. (2004) *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends Microbiology*. 12, 378–385.
 129. LINDSAY, J. A. (2010): Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*. 300, 98–103.
 130. LINDSAY, J. A. (2014): *Staphylococcus aureus* genomics and the impact of horizontal gene transfer. *International Journal of Medical Microbiology*. 304, 103–109.
 131. LIU, C. – CHEN, Z.-J. – SUN, Z. – FENG, X. – ZOU, M. – CAO, W. – WANG, S. – ZENG, J. – WANG, Y. – SUN, M. (2015): Molecular characteristics and virulence factors in methicillin-susceptible, resistant, and heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* from central-southern China. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 48, 490–496.
 132. LIU, G. Y. – ESSEX, A. – BUCHANAN, J. T. (2005): *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *Journal of Experimental Medicine*. 202 (2), 209–215.
 133. LOUIE, L. – GOODFELLOW, J. – MATHIEU, P. – GLATT, A. – LOUIE, M. – SIMOR, A. E. (2002): Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 40, 2786–2790.
 134. LOVÁSZ, CS. (2014): A kémiai Nobel-díj és a *Staphylococcus aureus*. A modern tömegspektrometria szerepe a mikroorganizmusok azonosításában. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*. 60 (4), 326-343.
 135. LOVERING, A. L. – SAFADI, S. S. – STRYNADKA, N. C. J. (2012): Structural perspective of peptidoglycan biosynthesis and assembly. *Annual Review of Biochemistry*. 81, 451–478.
 136. LOZANO, C. – LÓPEZ, M. - GÓMEZ-SANZ, E. - RUIZ-LARREA, F. – TORRES, C. – ZARAZAGA, M. (2009): Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in food samples of animal origin in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 64 (6), 1325–1326.

137. MAES, N. – MAGDALENA, J. – ROTTIERS, S. – GHELDRE, Y. D. – STRUELENS, M. J. (2002): Evaluation of a triplex PCR assay to discriminate *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci and determine methicillin-resistance from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 40, 1514–1517.
138. 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. 1. rész: Baird-Parker-agar táptalajos eljárás (ISO 6888-1:1999).
139. MAIDEN, M. C. – BYGRAVES, J. A. – FEIL, E. – MORELLI, G. – RUSSELL, J. E. – URWIN, R. – ZHANG, Q. – ZHOU, J. – ZURTH, K. – CAUGANT, D. A. – FEAVERS, I. M. – ACHTMAN, M. – SPRATT, B. G. (1998): Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95 (6), 3140-3145.
140. MALACHOWA, N. - DELEO, F. R. (2010): Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 3057–3071.
141. MALACHOWA, N. – KOBAYASHI, S. D. - FREEDMAN, B. – DORWARD, D. W. –DELEO, F. R. (2013): *Staphylococcus aureus* leukotoxin GH promotes formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of Immunology*. 15:191 (12), 6022-6631.
142. MANUKUMAR, H. M. – UMESHA, S. (2017): MALDI-TOF-MS based identification and molecular characterization of food associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*. 7, 11414 1-16.
143. MARIUTTI, R. B. – TARTAGLIA, N. R. – SEYFFERT, N. - DE PAULA CASTRO, T. L. – ARNI, R. K. – AZEVEDO, V. A. - LE LOIR, Y. – NISHIFUJI, K. (2017): The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Exfoliative Toxins of Staphylococcus aureus*. IntechOpen. London.
144. MAZI, W. - SANGAL, V. - SANDSTROM, G. - SAEED, A. - YU, J. (2015). Evaluation of *spa*-typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using high-resolution melting analysis. *International Journal of Infectious Diseases*. 38, 125–128.

145. McCLINTOCK, B. (1950): The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 36, 344–355.
146. McCLINTOCK, B. (1951): Chromosome organization and genetic expression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 16, 13–47.
147. McCORMICK, J. K. – YARWOOD, J. M. – SCHLIEVERT, P. M. (2001): Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: *Annual Review of Microbiology*. 55, 77–104.
148. MCDUGAL, L. K. – STEWARD, C. D. – KILLGORE, G. E. – CHAITRAM, J. M. – MCALLISTER, S. K. – TENOVER, F. C. (2003): Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (11), 5113–5120.
149. MEDVECZKY I. - RUSVAI M. - VARGA J. - TUBOLY S. (1999): Állatorvosi járványtan I. - Állatorvosi mikrobiológia, bakteriológia, virológia, immunológia. Részletes bakteriológia fejezet. Mezőgazda Kiadó.
150. MEHLIN, C. – HEADLEY, C. M. – KLEBANOFF, S. J. (1999): An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization. *Journal of Experimental Medicine*. 189, 907–918.
151. MEHNDIRATTA, P. L. – BHALLA, P. (2014): Use of antibiotics in animal agriculture & emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones: Need to assess the impact on public health. *Indian Journal of Medical Research*. 140 (3), 339–344.
152. MILHEIRIC, O. C. – OLIVEIRA, D. C. - DE LENCASTRE, H. (2007): Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51:3374–3377.
153. MOELLERING, R. C. JR. (2012): MRSA: the first half century. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 67, 4–11.
154. MOHANASOUNDARAM, K. M. – LALITHA, M. K. (2008): Comparison of phenotypic versus genotypic methods in the detection of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Indian Journal of Medical Research*. 127, 78–84.
155. MURRAY P. R. (2012). What is new in clinical microbiology-microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 14, 419–423.

156. NAGY E. - ÁBRÓK M. - BARTHA N. - BERECHKI L. - JUHÁSZ E. - KARDOS G. - KRISTÓF K. - MISZTI C. - URBÁN E. (2014): Mátrix-asszisztált lézer deszorpciós, ionizációs, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria speciális alkalmazása a klinikai mikrobiológiai diagnosztika területén. *Orvosi Hetilap* 155 (38), 1495-1503.
157. NAGY, J. E. (2017): Hatékony fegyver a bőrfertőzések ellen. *Gyógyszertár*. 16 (2), 7-9. <https://www.magangyogyszereszek.hu/ax/axpid1.php?pid=842> letöltés dátuma: 2020. 07. 15.
158. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS – NCCLS (2004): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fourteenth informational supplement M100-S14. NCCLS, Wayne, PA.
159. NATIONAL FOOD INSTITUTE – NFI (2012): protocol for pcr amplification of *meca*, *mecc* (*mecalga251*), *spa* and *pvl* recommended by the eurl-ar 2st version. https://www.eurl-ar.eu/CustomerData/Files/Folders/21-protocols/279_pcr-spa-pvl-meca-mecc-sept12.pdf letöltés dátuma: 2021.01.15.
160. NORMANNO, G. - CORRENTE, M. - SALANDRA, G. L. - DAMBROSIO, A. - QUAGLIA, N. C. - PARISI, A. - GRECO, G. - BELLACICCO, A. L. - VIRGILIO, S. - CELANO, G. V. (2007): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *International Journal of Food Microbiology*. 117, 219-222.
161. ØSTERGAARD, C. - MØLLER, J. K. (2018): Subdivision of MRSA CC398 isolates using MALDI-TOF MS. *International Journal of Medical Microbiology*. 308 (4), 476-485.
162. O'HARA, F. P. - SUAYA, J. A. - RAY, G. T. - BAXTER, R. - BROWN, M. L. - MERA, R. M. - CLOSE, N. M. - THOMAS, E. - AMRINE-MADSEN, H. (2016): *spa* Typing and Multilocus Sequence Typing Show Comparable Performance in a Macroepidemiologic Study of *Staphylococcus aureus* in the United States. *Microbial Drug Resistance*. 22 (1), 88–96.
163. OKUDA, K. V. – TOEPFNER, N. – ALABI, A. S. – ARNOLD, B. – BELARD, S. – FALKE, U. (2016): Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* from Lambaren e. Gabon. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 35, 1963-1973.
164. OLATIMEHIN, A. – SHITTU, A. O. – ONWUGAMBA, F. C. – MELLMANN, A. – BECKER, K. – SCHAUMBURG, F. (2018): *Staphylococcus aureus* complex

- in the straw-colored fruit bat (*Eidolon helvum*) in Nigeria. *Frontiers in Microbiology*. 9, 162.
165. ONO, H. K. – OMOE, K. – IMANISHI, K. – IWAKABE, Y. – HU, D. L. – KATO, H. – SAITO, N. – NAKANE, A. – UCHIYAMA, T. – SHINAGAWA, K. (2008): Identification and Characterization of Two Novel Staphylococcal Enterotoxins, Types S and T. *Infection and Immunity*. 76, 4999–5005.
 166. 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.
 167. ORSZÁGOS EPIDEMIOLÓGIAI KÖZPONT – OEP (2005): Területen szerzett methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) által okozott nosocomiális járvány szülészeti és újszülött osztályon. *Epinfo*. 12 (23), 253-255.
 168. PÁL, T. (2013): Az orvosi mikrobiológiai tankönyve. Részletes bakteriológia fejezet. *Medicina Könyvkiadó*.
 169. PARKER, M. W. – FEIL, S. C. (2005): Pore-forming protein toxins: From structure to function. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 88, 91–142.
 170. PEACOCK, S. J. - DE SILVA, G. D. - JUSTICE, A. - COWLAND, A. - MOORE, C. E. - WINEARLS, C. G. – DAY, N. P. (2002): Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis as tools for typing *Staphylococcus aureus* isolates in a microepidemiological setting. *Journal of Clinical Microbiology*. 40, 3764-3770.
 171. PEREIRA, V. – LOPES, C. – CASTRO, A. – SILVA, J. – GIBBS, P. – TEIXEIRA, P. (2009): Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiology*. 26 (3), 278–282.
 172. 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.
 173. PERIASAMY, S. – JOO, H. S. – DUONG, A. C. – BACH, T. H. L. – TAN, V. Y. – CHATTERJEE, S. S. – CHEUNG, G. Y. C. – OTTO, M. (2012): How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic

- structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109, 1281–1286.
174. PILLSBURY, A. - CHIEW, M. - BATES, J. - SHEPPEARD, V. (2013). An outbreak of staphylococcal food poisoning in a commercially catered buffet. *Communicable diseases intelligence*. 37, 144–148.
 175. PINCHUK, I. V. - BESWICK, E. J. - REYES, V. E. (2010). Staphylococcal enterotoxins. *Toxins*. 2, 2177–2197.
 176. PRANADA, A. B. – BIENIA, M. – KOSTRZEWA, M. (2016). Optimization and Evaluation of MRSA Detection by Peak Analysis of MALDI-TOF Mass Spectra, in DGHM 2016 https://www.msaccl.org/view_abstract/MSACCL_2017_EU.php?id=305 letöltés dátuma: 2020.07.18.
 177. PRÉVOST, G. – CRIBIER, B. – COUPPIÉ, P. – PETIAU, P. – SUPERSAC, G. - FINCK-BARBANÇON, V. – MONTEIL, H. – PIEMONT, Y. (1995): Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infection and Immunity*. 63, 4121–4129.
 178. PRICE, L. B. – STEGGER, M. – HASMAN, H. – AZIZ, M. – LARSEN, J. – ANDERSEN, P. S. – PEARSON, T. – WATERS, A. E. – FOSTER, J. T. – SCHUPP, J. – GILLECE, J. – DRIEBE, E. – LIU, C. M. – SPRINGER, B. – ZDOVC, I. – BATTISTI, A. – FRANCO, A. – ZMUDZKI, J. – SCHWARZ, S. – BUTAYE, P. – JOUY, E. – POMBA, C. – PORRERO, M. C. – RUIMY, R. – SMITH, T. C. – ROBINSON, D. A. – WEESE, J. S. – ARRIOLA, C. S. – YU, F. – LAURENT, F. – KEIM, P. – SKOV, R. – AARESTRUP, F. M. (2012): *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin-resistance in livestock. *mBio* 3, 00305-11.
 179. RAMMELKAMP, C. H. – MAXON, T. (1942): Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. *Experimental Biology and Medicine*. 51, 386–389.
 180. RHEE, C. H. – WOO, G. J. (2010): Emergence and characterization of foodborne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Korea. *Journal of Food Protection*. 73 (12), 2285–2290.

181. RICHARDSON, J. F. – REITH, S. (1993): Characterization of a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-15) by conventional and molecular methods. *Journal of Hospital Infection*. 25, 45–52.
182. RIGAILL, J. – GRATTARD, F. – GRANGE, S. (2017): Community-acquired *Staphylococcus argenteus* sequence type 2250 bone and joint infection, France, 2017. *Emerging Infectious Diseases*. 24 (10), 1958–1961.
183. RIZEK, C. F. – MATTÉ, M. H. – DROPA, M. – MAMIZUKA, E. M. - DE ALMEIDA, L. M. (2011): Identification of *Staphylococcus aureus* carrying the *mecA* gene in ready-to-eat food products sold in Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease*. 8 (4), 561–563.
184. RODVOLD, K. A. – MCCONEGHY, K. W. (2014): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: past, present, and future. *Clinical Infectious Diseases*. 58, 20–27.
185. ROZGONYI, F. - ANDERLIK, P. - CSER, V. - GHIDÁN, Á. - KRISTÓF, K. – MARÓDI, CS. – OSTORHÁZI, E. (2009): A methicillin-rezisztens és érzékeny *Staphylococcus aureus* törzsek virulenciájának genetikai, valamint az általuk okozott fertőzések molekuláris pathomechanizmusának in vitro és in vivo vizsgálata. Munkabeszámoló. OTKA.
186. SALIMENA, A. P. - LANGE, C.C. - CAMUSSONE, C. – SIGNORINI, M. – CALVINHO, L. F. – BRITO, M. A. - BORGES, C. A. - GUIMARÃES, A. S. – RIBEIRO, J. B. - MENDONÇA, L.C. - PICCOLI, R. H. (2016): Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms. *Veterinary Research Communications*. 40 (3-4), 97-106.
187. SCHAUMBURG, F. – ALABI, A.S. – KOCK, R. – MELLMANN, A. – KREMSNER, P. G. – BOESCH, C. (2012): Highly divergent *Staphylococcus aureus* isolates from African non-human primates. *Environmental Microbiology*. 4, 141-146.
188. 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.
189. SEILIE, E. S. – WARDENBURG, J. B. (2017): *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: The interface of pathogen and host complexity. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 72, 101–116.
 190. SERGELIDIS, D. - ANGELIDIS, A. S. (2017): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a controversial food-borne pathogen. *Letters in Applied Microbiology*. 409-418.
 191. SHI, X. – ZHANG, D-F. (2018): *Staphylococcus argenteus*: an emerging foodborne pathogen? *Current Opinion in Food Science* 20, 76–81.
 192. SIEGRIST, T. J. - ANDERSON, P. D. - HUEN, W. H. - KLEINHEINZ, G. T. - MCDERMOTT, C. M. - SANDRIN, T. R. (2007) Discrimination and characterization of environmental strains of *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Journal of Microbiological Methods*. 68, 554–562.
 193. SIMON, ZS. (2016): MALDI-TOF módszer felhasználási lehetőségei mikrobák azonosítására. https://hu.wessling-group.com/fileadmin/user_upload/wessling_hu/hirek/Maldi-tof_.pdf letöltés dátuma: 2020.07.26.
 194. SKINNER, D. - KEEFER, C. S. (1941): Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*: a study of one hundred and twenty-two cases and a review of the literature concerned with experimental infection in animals. *Archives of Internal Medicine*. 68, 851–875.
 195. SKOV, R. R. - SMYTH, M. - CLAUSEN, A. R. - LARSEN, N. - FRIMODT-MOLLER, B. - OLSSON-LILJEQUIST, K. (2003): Evaluation of a cefoxitin 30 µg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52, 204-207.
 196. SLIFIERZ, M. J. – FRIENDSHIP, R. M. – WEESE, J. S. (2015b). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in commercial swine herds is associated with disinfectant and zinc usage. *Applied and Environmental Microbiology*. 81, 2690–2695.
 197. SLIFIERZ, M. J. - FRIENDSHIP, R. - WEESE, J.S. (2015a): Zinc oxide therapy increases prevalence and persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs: a randomized controlled trial. *Zoonoses and Public Health*. 301-308.

198. SOGAWA, K. – WATANABE, M. – ISHIGE, T. – SEGAWA, S. – MIYABE, A. – MURATA, S. – SAITO, T. – SANDA, A. – FURUHATA, K. – NOMURA, F. (2017): Rapid Discrimination Between Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Biocontrol Science*. 22 (3), 163-169.
199. SONG, L. – HOBAUGH, M. R. – SHUSTAK, C. – CHELEY, S. – BAYLEY, H. – GOUAUX, J. E. (1996): Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science*. 274, 1859–1866.
200. SPRATT, B. G. (1999): Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Current Opinion in Microbiology*. 2 (3), 312-316.
201. STAPLETON, P. D.; TAYLOR, P. W. (2002): Methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Science progress*. 85 (1), 57-72.
202. STROMMINGER, B. – BRAULKE, C. – HEUCK, D. – SCHMIDT, C. – PASEMANN, B. – NÜBEL, U. – WITTE, W. (2008): *spa* Typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 46 (2), 574-581.
203. STRYJEWSKI, M. E. – COREY, G. R. (2014): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen. *Clinical Infectious Diseases*. 58, 10–19.
204. SUNG, J. M. - LLOYD, D. H. - LINDSAY, J. A. (2008). *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiology* 154, 1949–1959.
205. SUZUKI, Y. – KUBOTAA, H. – ONOB, H. K. – KOBAYASHIA, M. – MURAUCHIA, K. – KATOA, R. – HIRAIA, A. – SADAMASU, K. (2017): Food poisoning outbreak in Tokyo, Japan caused by *Staphylococcus argenteus*. *International Journal of Food Microbiology*. 262, 31-37.
206. SUZUKI, T. - CAMPBELL, J. - SWOBODA, J. G. - WALKER, S. - GILMORE, M. S. (2011): Role of Wall Teichoic Acids in *Staphylococcus aureus* Endophthalmitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 52 (6), 3187–3192.

207. SZABÓ, R. (2015): A methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* gyakorisága és kockázati tényezői a bentlakásos szociális intézményekben. Nemzetközi kitekintés. *Orvosi Hetilap*. 157 (27) 1071-1078.
208. THAIPADUNGPANIT, J. – AMORNCHAI, P. – NICKERSON, E. K. (2015): Clinical and molecular epidemiology of *Staphylococcus argenteus* infections in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*. 53 (3), 1005–1008.
209. 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.
210. TIEDEMANN, R. E. – FRASER, J. D. (1996). Cross-linking of MHC class II molecules by staphylococcal enterotoxin A is essential for antigen-presenting cell and T cell activation. *Journal of Immunology*. 157, 3958–3966.
211. TIEMERSMA, E. W. - BRONZWAER, S. L. A. M. - LYYTIKÄINEN, O. - DEGENER, J. E. - SCHRIJNEMAKERS, P. - BRUINSMA, N. - MONEN, J. – WITTE, W. - GRUNDMAN, H. (2004): Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* in Europe, 1999-2002. European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants. *Emerging Infectious Diseases* 10 (9), 1627-1634.
212. TONG, S. Y. C. - SHARMA-KUINKEL, B. K. – THADEN, J. T. (2013): Virulence of endemic nonpigmented Northern Australian *Staphylococcus aureus* clone (clonal complex 75, S-argenteus) is not augmented by staphyloxanthin. *The Journal of Infectious Diseases*. 208 (3), 520–527.
213. TONG, S. Y. C. - SCHAUMBURG, F. - ELLINGTON, M. J. - CORANDER, J. - PICHON, B. - LEENDERTZ, F. - BENTLEY, S. D. - PARKHILL, J. - HOLT, D. C. - PETERS, G. - GIFFARD, P. M. (2015): Novel staphylococcal species that form part of a *Staphylococcus aureus*-related complex: the non-pigmented *Staphylococcus argenteus* sp. nov. and the non-human primate-associated *Staphylococcus schweitzeri* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65, 15–22.
214. TÓTH, Á. – KRISTÓF, K. – NIKOLOVA, R. – TIRCZKA, T. (2014): Szakmai tájékoztató az EUCAST antibiotikum érzékenység vizsgálati rendszerére való áttéréshez – Útmutató aerob és mikroaerofil baktériumok antibiotikum

- érzékenységének korongdiffúziós meghatározásához – EUCAST v4.0 verzió alapján. Országos Epidemiológiai Központ. *Mikrobiológiai Körlevél*. 14 (1).
215. TRINDADE, P. A. – MCCULLOCH, J. A. – OLIVEIRA, G. A. – MAMIZUKA, E. M. (2003): Molecular techniques for MRSA typing: Current issues and perspectives. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 7, 32-43.
216. TÜBBICKE, A. - HU⁷BNER, C. – KRAMER, A. - HU⁷BNER, N. O. – FLE⁷BA, S. (2012): Transmission rates, screening methods and costs of MRSA – a systematic literature review related to the prevalence in Germany. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 31, 2497–2511.
217. URBASKOVA, P. - MELTER, O. - MACKOVA, B. - JAKUBU, V. – WUNSCHOVA, M. (2004): Detection of MRSA in a group of 752 strains of *S. aureus* using a cefoxitin disk. *Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology*. 53, 62-65.
218. VÁGÓÁLLAT ÉS HÚS SZAKMAKÖZI SZERVEZET – VHT (2015): Nemzetközi információk. Közlemény. 6.
219. VAN ALEN, S. - BALLHAUSEN, B. – PETERS, G. - FRIEDRICH, A. W. – MELLMANN, A. – KÖCK, R. – BECKER, K. (2017): In the centre of an epidemic: Fifteen years of LA-MRSA CC398 at the University Hospital Münster. *Veterinary Microbiology*. 200, 19-24.
220. VAN LOO, I. H. M. – DIEDEREN, B. M. – SAVELKOUL, P. H. – WOUDENBERG, J. H. – ROOSENDAAL, R. (2007): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*. 13 (11), 1753–1755.
221. VAN RIJEN, M. M. – BOSCH, T. – VERKADE, E. J. – SCHOULS, L. – KLUYTMANS, J. A. – GROUP, C. S. (2014): Livestock-associated MRSA carriage in patients without direct contact with livestock. *PLoS One*. 9 (6), 100294.
222. VANDENESCH, F. – NAIMI, T. – ENRIGHT, M. C. – LINA, G. – NIMMO, G. R. – HEFFERNAN, H. – LIASSINE, N. – BES, M. – GREENLAND, T. – REVERDY, M. E. (2003): Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: Worldwide emergence. *Emerging Infectious Diseases*. 9, 978–984.
223. VENTURA, C. L. – MALACHOWA, N. – HAMMER, C. H. – NARDONE, G. A. – ROBINSON, M. A. – KOBAYASHI, S. D. – DELEO, F. R. (2010):

- Identification of a novel *Staphylococcus aureus* two-component leukotoxin using cell surface proteomics. *PLoS ONE*. 5, 116-34.
224. VERGELY, A. (2019): Fewer antibiotics in European livestock farming. *European Data Journalism Network*.
<https://www.europeandatajournalism.eu/eng/News/Data-news/Fewer-antibiotics-in-European-livestock-farming> letöltés dátuma: 2020.06.19.
225. VERKADE, E. - VAN BENTHEM, B. - DEN BERGH, M. K. - VAN CLEEF, B. - VAN RIJEN, M. - BOSCH, T. - KLUYTMANS, J. (2013): Dynamics and determinants of *Staphylococcus aureus* carriage in livestock veterinarians: a prospective cohort study. *Clinical Infectious Diseases*. 57 (2), 11-17.
226. VERWEY, W. (1940). A type-specific antigenic protein derived from the *Staphylococcus*. *Journal of Experimental Medicine*. 71, 635–644.
227. VOSS, A. - LOEFFEN, F. - BAKKER, J. - KLAASSEN, C. - WULF, M. (2005): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging Infectious Diseases*. 11 (12), 1965-1966.
228. WAKABAYASHI, Y. - UMEDA, K. - YONOGI, S. - NAKAMURA, H. - YAMAMOTO, K. - KUMEDA, Y. - KAWATSU, K. (2017): Staphylococcal Food Poisoning Caused by *Staphylococcus Argenteus* Harboring Staphylococcal Enterotoxin Genes. *International Journal of Food Microbiology*. 265, 23-29.
229. WALKER, J. - FOX, A. J. - EDWARDS-JONES, V. - GORDON, D. B. (2002): Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* media effects and inter-laboratory reproducibility. *Journal of Microbiological Methods*. 48, 117–126.
230. WANG, W. - BALOCH, Z. - JIANG, T. - ZHANG, C. - PENG, Z. - LI, F. (2017): Enterotoxigenicity and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from retail food in China. *Frontiers in Microbiology*. 8, 2256.
231. WENDLANDT, S. - SCHWARZ, S. - SILLEY, P. (2013): Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Food-Borne Pathogen? *Annual Review of Food Science and Technology*. 4, 117-139.
232. WIENEKE, A. A. - ROBERTS, D. - GILBERT, R. J. (1993). Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-90. *Epidemiology and Infection*. 110, 519–531.

233. WISE, R. – HART, T. – CARS, O. – STREULENS, M. – HELMUTH, R. – HUOVINEN, P. (1998): Antimicrobial resistance: Is a major threat to public health. *British Medical Journal*. 317, 609–610.
234. WITTE, W. - STROMMENDER, B. - STANEK, C. - CUNY, C. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases*. 13, 255–258.
235. WOLTERS, M. - ROHDE, H. - MAIER, T. - BELMAR-CAMPOS, C. - FRANKE, G. - SCHERPE, S. - AEPFELBACHER, M. - CHRISTNER, M. (2011) MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *International Journal of Medical Microbiology*. 301, 64–68.
236. 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.
237. YANG, H. Y. – SUH, J. T. – LEE, H. J. (2010): Evaluation of commercial selective agars in screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 40, 252–256.
238. YOONG, P. – TORRES, V. J. (2013): The effects of *Staphylococcus aureus* leukotoxins on the host: Cell lysis and beyond. *Current Opinion in Microbiology*. 16, 63–69.
239. ZHANG, D-F. - ZHI, X-Y. - ZHANG, J. - PAOLI, G. C. - CUI, Y. - SHI, C.-SHI, X. (2017): Preliminary comparative genomics revealed pathogenic potential and international spread of *Staphylococcus argenteus*. *BMC Genomics*. 18, 808.
240. ZINN, C.S. - WESTH, H. - ROSDAHL, V. T. - SARISA, T. (2004): An international multicenter study of antimicrobial resistance and typing of hospital *Staphylococcus aureus* isolates from 21 laboratories in 19 countries or states. *Microbial Drug Resistance*. 160 (8).
241. ZONG, Z. – PENG, C. – LÜ, X. (2011): Diversity of SCCmec elements in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci clinical isolates. *PLoS ONE*. 6 (5), 20191.

10. 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 Petróczki, 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 Cziba, Ferenc Peles, Éva Bacskainé Bódi, Andrea Kántor, Flóra Mária Szabóné Petróczki, 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 könyvrészek (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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.03.24.



11. NYILATKOZATOK

NYILATKOZAT

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola keretében készítettem, a Debreceni Egyetem doktori (Ph.D.) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2021. április. 5.

.....
a jelölt aláírása

NYILATKOZAT

Tanúsítom, hogy Horváth Brigitta doktorjelölt 2016-2020 között a fent megnevezett Doktori Iskola keretében irányításunkkal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult, az értekezés a jelölt önálló munkája. Az értekezés elfogadását javasoljuk.

Debrecen, 2021. április 5.

.....
a témavezető aláírása

.....
a témavezető aláírása

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban köszönettel tartozom, a **Debreceni Egyetem Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskolának**, külön kiemelve vezetőjét, **Dr. Komlósi Istvánt**, aki végig támogatatta kutatási témámat.

Köszönöm témavezetőim, **Dr. Micsinai Adrienn** és **Dr. Peles Ferenc Árpád** kitartó, áldozatos munkáját és segítségét. Támogatásukkal és szakmai tanácsaikkal segítettek munkámat, a téma kiválasztásától a disszertáció megírásáig.

Köszönöm a **WESSLING Hungary Kft.** ügyvezető igazgatójának, **Dr. Zanathy Lászlónak** és minden munkatársának, hogy lehetőséget biztosított a MALDI-TOF MS vizsgálatok elvégzéséhez. Köszönetemet szeretném kifejezni, a mikrobiológiai osztály minden dolgozójának, külön kiemelve **Gasparikné Dr. Reichardt Judit, Róka Éva, Kis Éva, Pocklán Edit** és **Pásztor Ákos** munkáját. Külön hálával tartozom **Lovász Csabának**, a **WESSLING Hungary Kft.** volt munkatársának, a munkám során kapott értékes szakmai tanácsaiért.

Köszönöm a **Biomi Kft.** munkatársainak, kiemelve, **Dr. Sipos Ritát** és **Erős Ágnest**, akik nagy szakértelmükkel és kedvességükkel segítettek munkámat a szekvencia alapú vizsgálatok során.

Köszönöm a **MikroMikoMed Kft.** munkatársainak és vezetőjének, **Dr. Széll Andrásnak** és **Bereczki Lászlónak**, hogy helyet és lehetőséget biztosított az előkísérletek során, a minta-előkészítési módszer kidolgozására.

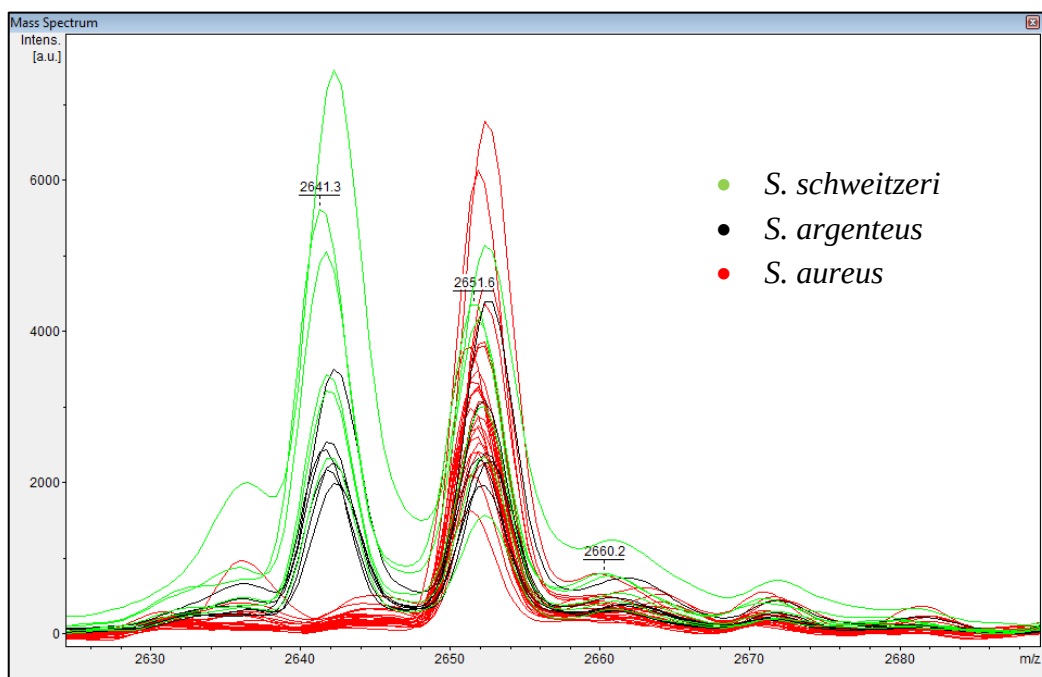
Köszönettel tartozom **Dr. Biksi Imrének** és **Dr. Albert Ervinnek**, az Állatorvostudományi Egyetem Haszonállat-gyógyászati Tanszék és Klinika Diagnosztikai Laboratórium munkatársának, aki szakmai tanácsaival és értékes meglátásaival segítette tudományos publikációm elkészítését és a munkámat.

Hálával tartozom, **Bojté Csillának**, aki kutatási témám kiválasztásában és előrehaladásában, önzetlenül és kitartóan segített, valamint, hogy barátságával megkönnyítette és szebbé tette mindennapi munkámat.

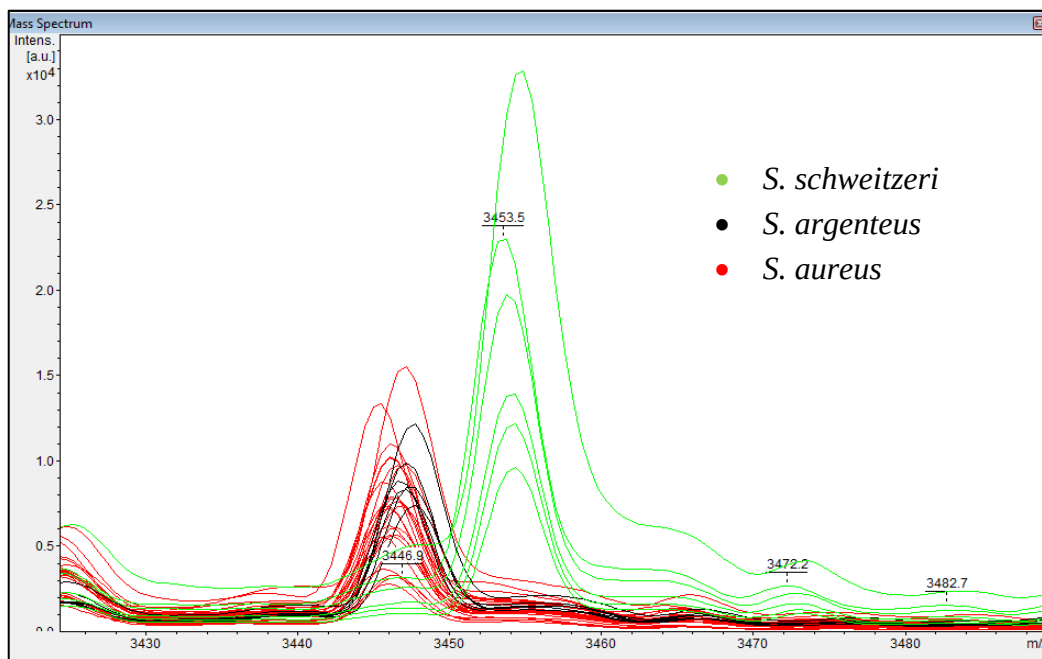
Végül, de nem utolsósorban hálával és köszönettel tartozom apukámnak, **Horváth Lászlónak**, aki elolvasta és stilizálta disszertációmat és **anyukámnak**, a **férjemnek** valamint a **kislányomnak**, hogy támogattak és kiegyensúlyozott családi háttérrel biztosítottak, ezáltal lehetővé téve munkámat és előrehaladásomat.

12. MELLÉKLETEK

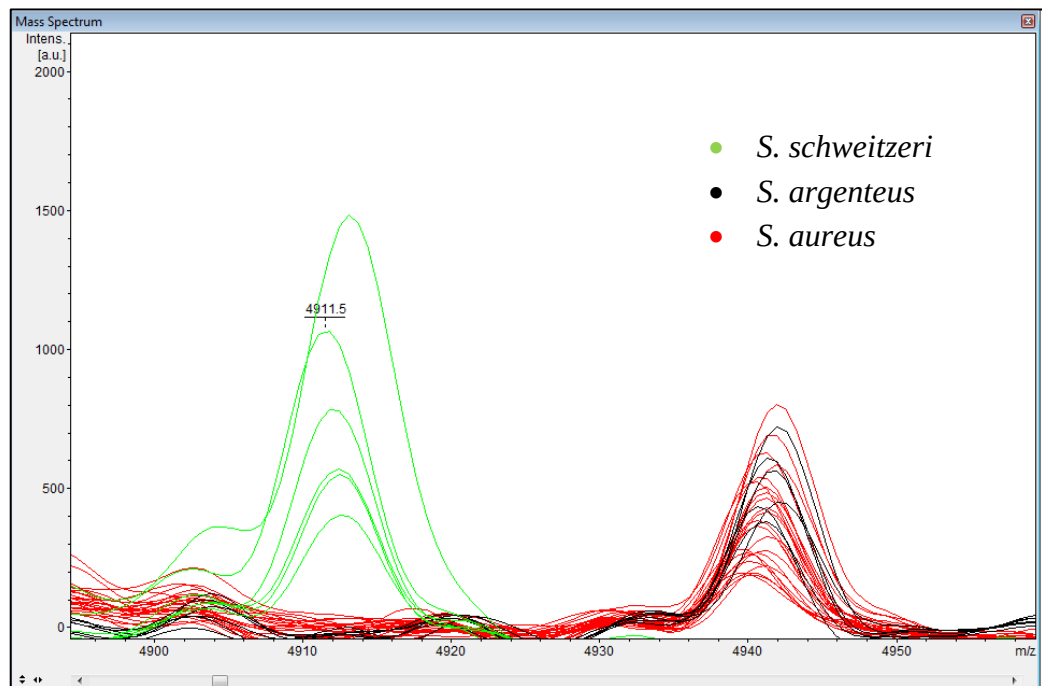
1. melléklet: A *S. argneteus* és *S. schweitzeri* fajokra specifikus, 2641 m/z csúcs detektálása



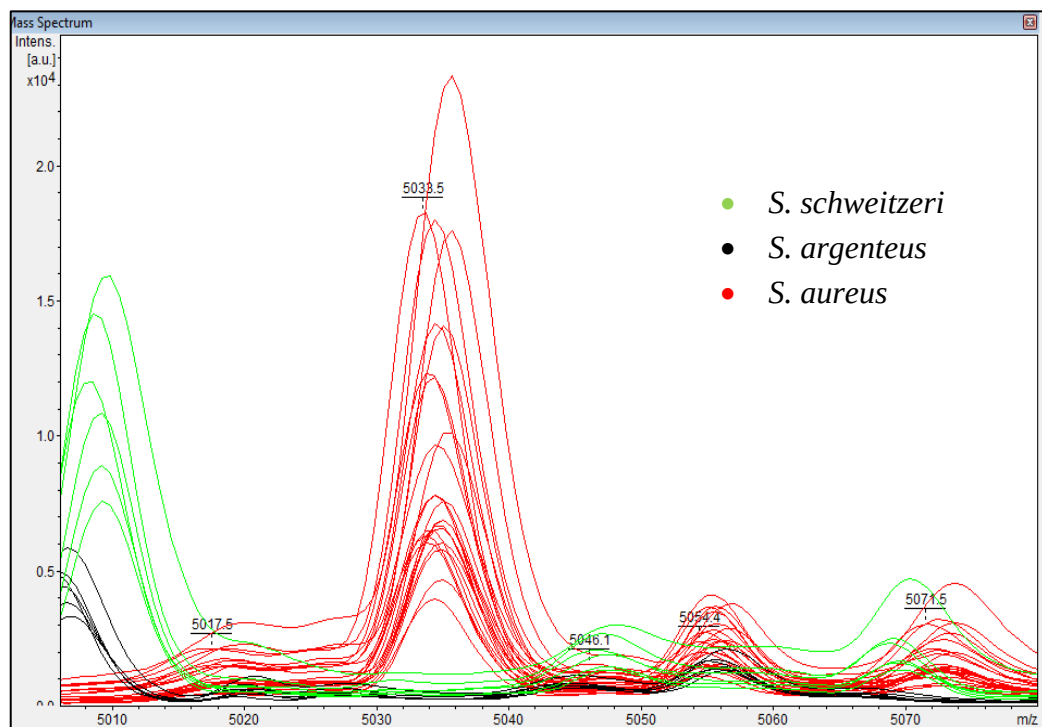
2. melléklet: A *S. schweitzeri* fajra specifikus 3453 m/z csúcs detektálása



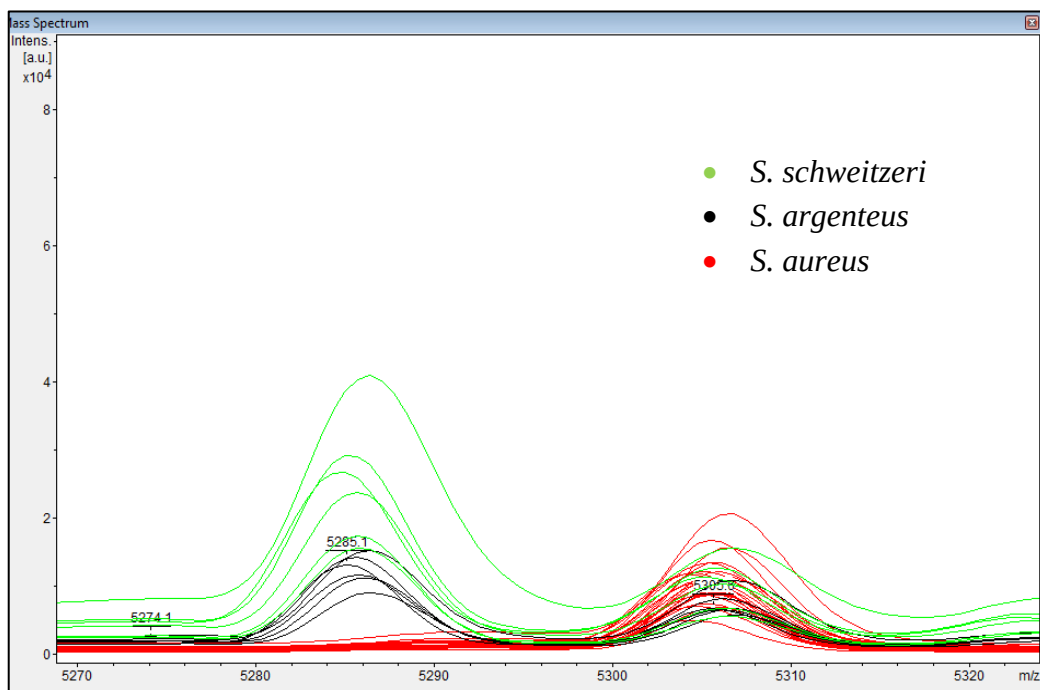
3. melléklet: A *S. schweitzeri* fajra specifikus 4911 m/z csúcs és a *S. aureus* valamint *S. argenteus* specifikus 4942 m/z csúcs detektálása



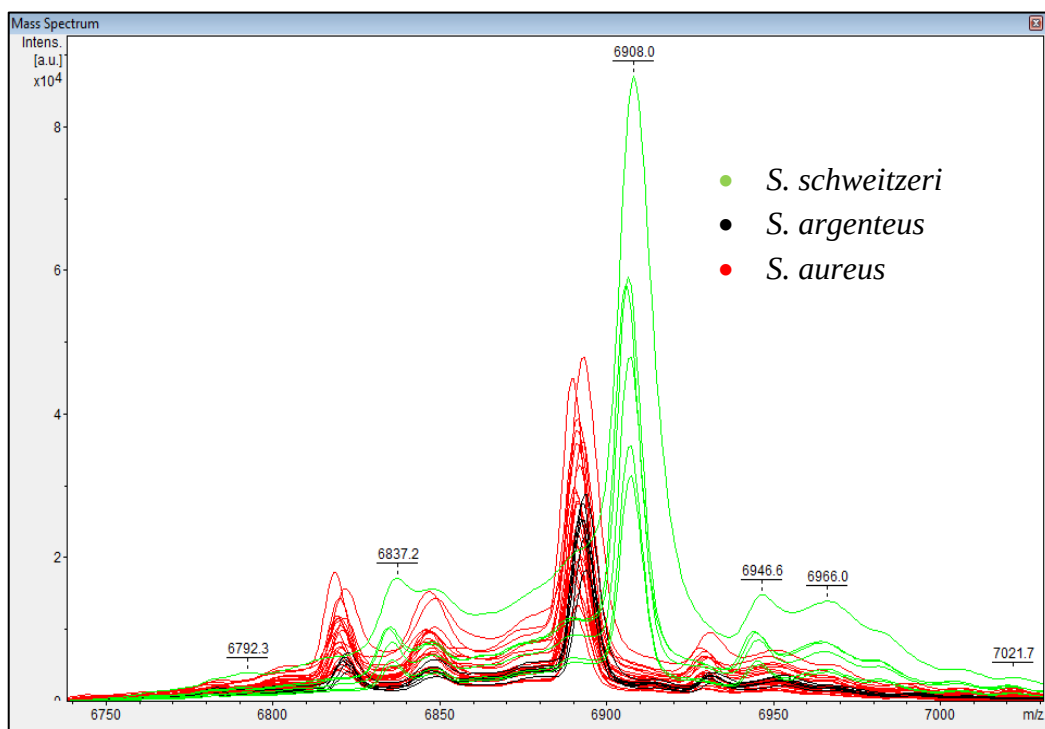
4. melléklet: A *S. aureus* fajra specifikus, 5032 m/z csúcs detektálása



5. melléklet: A *S. argenteus* és *S. schweitzeri* fajra specifikus, 5286 m/z csúcs detektálása



6. melléklet: A *S. aureus* és *S. argenteus* fajra specifikus, 6818 m/z csúcs detektálása



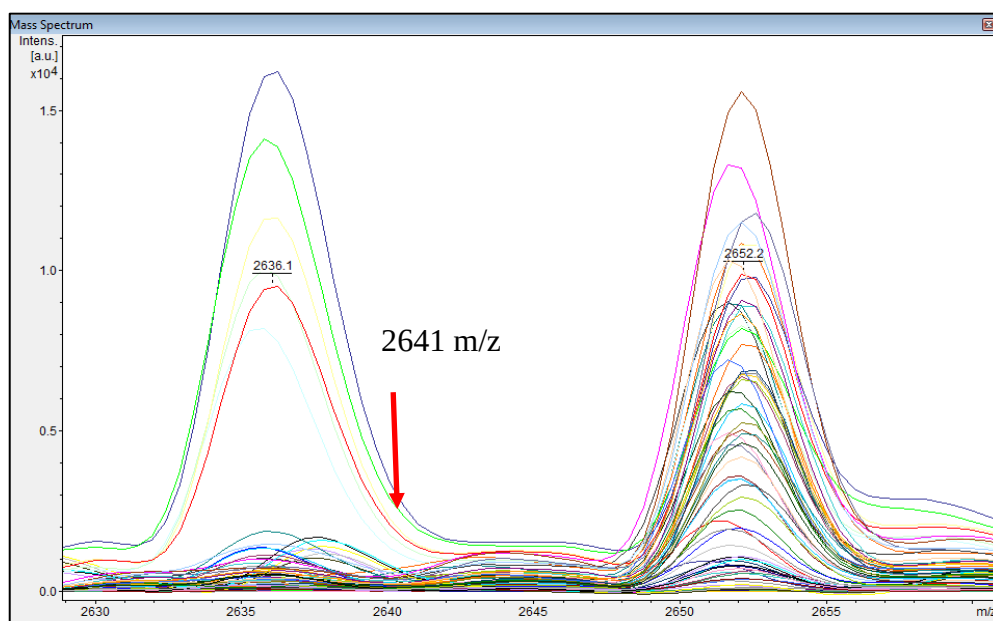
7. melléklet: A „SAC” fajaiban vizsgált csúcsok relatív intenzitás értékeinek szórása

Vizsgált ion fragment értékek átlagai	Relatív intenzitás értékeinek szórása		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. argenteus</i>	<i>S. schweitzeri</i>
2636 m/z	2,42	0,75	0,55
3891 m/z	2,16	3,62	3,93
4306 m/z	11,98	0,84	1,38
4814 m/z	0,75	3,82	1,33
6354 m/z	1,51	1,37	3,08
6889 m/z	6,75	0,84	2,73
8091 m/z	4,40	3,44	2,56
8891 m/z	1,63	1,17	0,63
9627 m/z	2,16	2,71	1,51

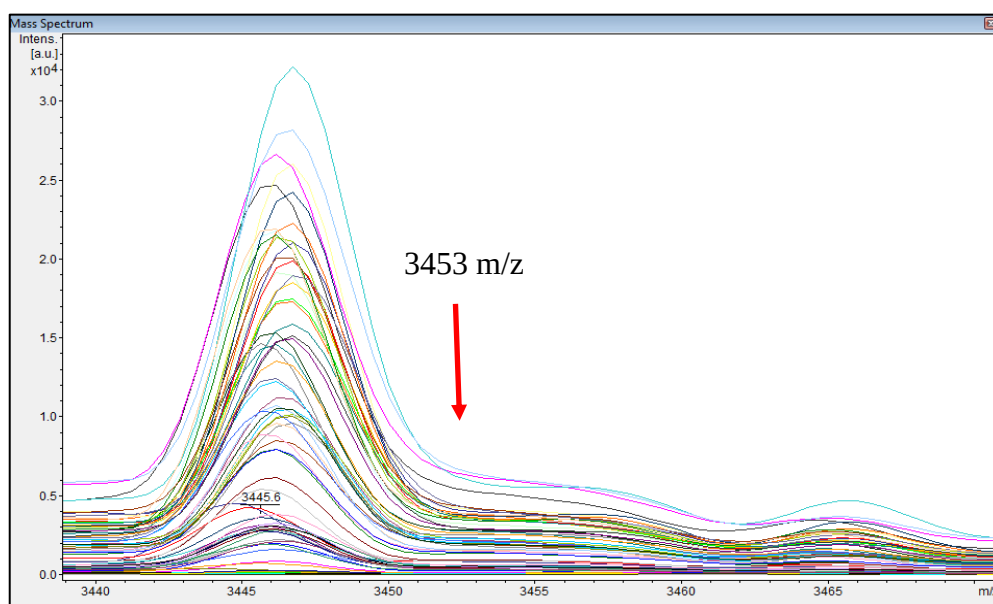
8. melléklet: A „SAC” fajaiban vizsgált csúcsok jel/zaj arány értékeinek szórása

Vizsgált ion fragment értékek átlagai	Jel/zaj arány értékeinek szórása		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. argenteus</i>	<i>S. schweitzeri</i>
2636 m/z	7,03	2,81	1,63
3891 m/z	2,04	2,56	0,52
4306 m/z	5,75	3,50	5,12
4814 m/z	5,67	1,41	2,07
6354 m/z	1,37	2,07	1,10
6889 m/z	10,50	10,15	3,85
8091 m/z	1,51	0,98	2,79
8891 m/z	1,03	0,41	2,16
9627 m/z	1,21	1,94	2,93

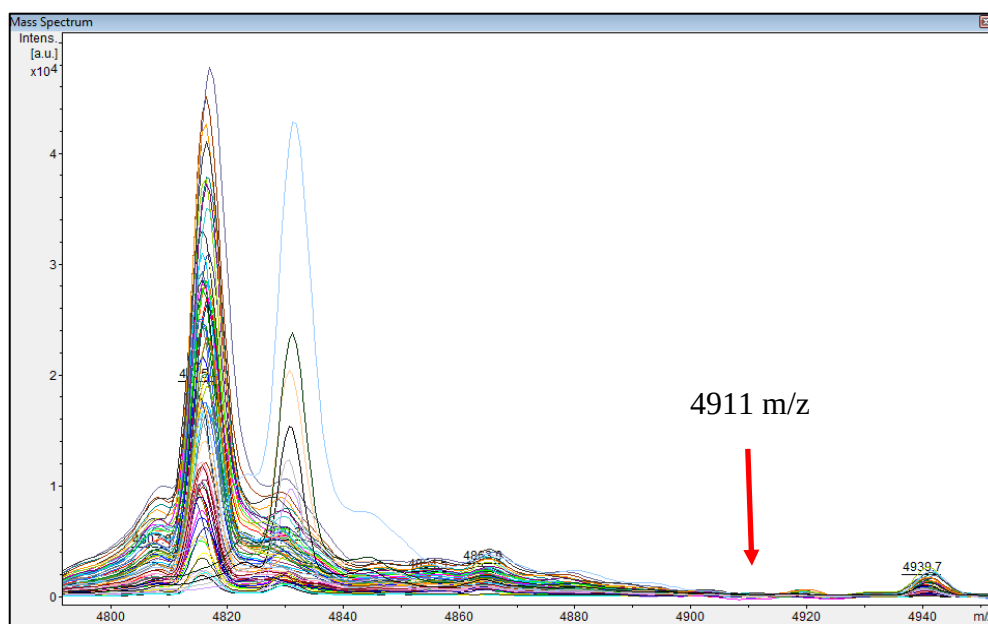
9. melléklet: A *S. argenteus* és *S. schweitzeri* fajokra specifikus, 2641 m/z csúcs hiánya az élelmiszerekből és haszonállatokból izolált *S. aureus* törzsek tömegspektrumaiban



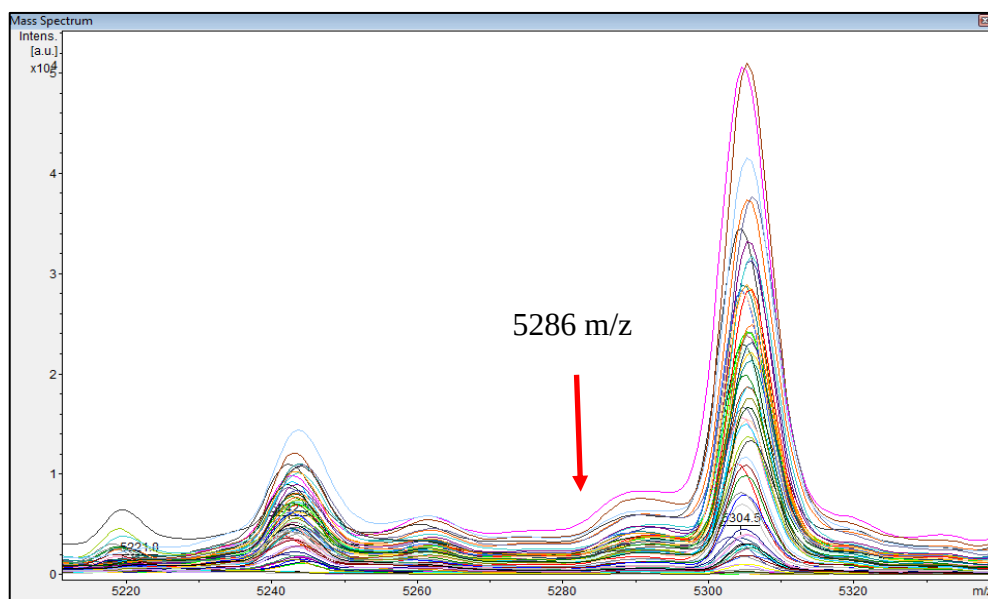
10. melléklet: A *S. schweitzeri* fajra specifikus, 3453 m/z csúcs hiánya az élelmiszerekből és haszonállatokból izolált *S. aureus* törzsek tömegspektrumaiban



11. melléklet: A *S. schweitzeri* fajra specifikus, 4911 m/z csúcs hiánya az élelmiszerekből és haszonállatokból izolált *S. aureus* törzsek tömegspektrumaiban



12. melléklet: A *S. argenteus* és *S. schweitzeri* fajokra specifikus, 5286 m/z csúcs hiánya az élelmiszerekből és haszonállatokból izolált *S. aureus* törzsek tömegspektrumaiban



13. melléklet: *S. aureus* komplex specifikus csúcsok jelenléte (+) és hiánya (-) az élelmiszerekből izolált *S. aureus* törzsek tömegspektrumaiban

ID	<i>S. aureus</i> klonális komplex specifikus csúcsok (m/z)																							
	2636	3891	4306	4814	6354	6889	8091	8891	9627	10105	5045	6613	3037	5002	6580	2201	2289	2307	2685	3007	3875	4485	4497	5507
SA-1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
SA-10	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
SA-18	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
SA-2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+
SA-49	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
SA-7	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+
SA-21	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
SA-22	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
SA-11	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
SA-12	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
SA-13	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
SA-16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
SA-44	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
SA-17	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
SA-20	-		+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
SA-28	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
SA-29	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+
SA-4	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SA-31	+	-	-	+		+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+
SA-5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
SA-6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
SA-32	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
SA-25	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+
SA-33	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
SA-24	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
SA-34	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
SA-9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-		-	+	+	-	-	+
SA-35	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
SA-36	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
SA-37	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
SA-15	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+

SA-38	-	-	-	+	+	+	+	+		+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
SA-02	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
SA-01	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
SA-39	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
SA-40	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
SA-41	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
SA-3	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
SA-8	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
SA-14	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
SA-42	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
SA-43	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
SA-47	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
SA-45	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-		-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
SA-46	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
SA-27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+

14. melléklet: *S. aureus* komplex specifikus csúcsok jelenléte (+) és hiánya (-) a haszonállatokból izolált *S. aureus* törzsek tömegspektrumaiban

ID	<i>S. aureus</i> klonális komplex specifikus csúcsok																												
	2636	3891	4306	4814	6354	6889	8091	8891	9627	10105	5045	6613	3037	5002	6580	2201	2289	2307	2685	3007	3875	4485	4497	5507	5525	5539	5551	6423	6552
SA-127	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
SA-146	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
SA-297	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
SA-136	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
SA-237	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
SA-034	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
SA-113	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+
SA-126	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
SA-116	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
SA-121	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
SA-145	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
SA-329	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
SA-065	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
SA-127	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+

15. melléklet: Előző tanulmányokban és általam meghatározott specifikus csúcsok
tesztelése a haszonállatokból izolált *S. aureus* törzseken

ID	MRSA specifikus csúcsok														
	2127	2414	3043	4607	5070	6576	6885	9216	9632	10152	2453	4461	2548	2718	3885
SA-127	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+
SA-146	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
SA-297	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
SA-136	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
SA-237	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
SA-034	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
SA-113	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
SA-126	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
SA-116	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
SA-121	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
SA-145	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
SA-329	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
SA-065	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+

16. melléklet: Előző tanulmányokban és általam meghatározott specifikus csúcsok
tesztelése a klinikai mintából izolált *S. aureus* törzseken

ID	MRSA specifikus csúcsok														
	2127	2414	3043	4607	5070	6576	6885	9216	9632	10152	2453	4461	2548	2718	3885
G1-1	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
G1-18	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
G1-01	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
G1-17	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
G1-12	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
G1-22	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
G1-29	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
G1-40	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-

17. melléklet: Előző tanulmányokban és általam meghatározott specifikus csúcsok tesztelése az élelmiszerekből izolált *S. aureus* törzseken

ID	MRSA specifikus csúcsok (m/z)														
	2127	2414	3043	4607	5070	6576	6885	9216	9632	10152	2453	4461	2548	2718	3885
SA-1	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SA-10	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
SA-18	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SA-2	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA-49	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
SA-7	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA-21	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SA-22	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SA-11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SA-12	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
SA-13	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
SA-16	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
SA-44	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SA-17	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
SA-20	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SA-28	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SA-29	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
SA-4	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
SA-31	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
SA-5	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SA-6	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
SA-32	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SA-25	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SA-33	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SA-24	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SA-34	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SA-9	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA-35	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
SA-36	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA-37	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SA-15	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SA-38	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SA-02	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA-01	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
SA-39	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
SA-40	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SA-41	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SA-3	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA-8	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
SA-14	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
SA-42	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
SA-43	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA-47	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SA-45	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
SA-46	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
SA-27	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-