

HORVÁTH Brigitta<sup>a\*</sup>, PELES Ferenc<sup>a</sup>, GASPARIKNÉ REICHARDT Judit<sup>d</sup>,  
POCKLÁN Edit<sup>d</sup>, SIPOS Rita<sup>b</sup>, ERŐS Ágnes<sup>b</sup>, PETRÓCZKI Flóra Mária<sup>a</sup>,  
SZÚCS Kata Dorina<sup>c</sup>, ALBERT Ervin<sup>e</sup>, MICSINAI Adrienn<sup>d</sup>

DOI: <https://doi.org/10.52091/EVIK-2021/2-1-HUN>

Érkezett: 2021. február – Elfogadva: 2021. április

## Élelmiszerekből izolált staphylococcus fajok antibiotikum rezisztencia vizsgálata

**Kulcsszavak:** élelmiszer, Staphylococcus, antibiotikum rezisztencia, MALDI-TOF-MS, baktérium identifikálás, élelmiszerbiztonság, humán patogén, nozokómiás fertőzés

### 1. ÖSSZEFOGLALÁS

A meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) törzsek élelmiszerláncban előforduló jelenlétét számos tanulmány igazolta az Európai Unióban, azonban Magyarországon kevés adat áll rendelkezésünkre ezzel kapcsolatban. Jelen vizsgálat célja az élelmiszerekből izolált *Staphylococcus* törzsek antibiotikum rezisztenciájának vizsgálata klasszikus mikrobiológiai, molekuláris biológiai módszerekkel és MALDI-TOF-MS technikával, továbbá az antibiotikum rezisztens törzsek multilokus szekvencia tipizálása (MLST). A vizsgálat során 47 koaguláz-pozitív (CPS) és 30 koaguláz-negatív *Staphylococcus* (CNS) izolátumot gyűjtöttünk. A MALDI-TOF-MS vizsgálat során minden CPS izolátum (n=47) *S. aureus* fajnak bizonyult, míg a CNS törzsek esetében 8 különböző fajt azonosítottunk. Két *S. aureus* törzs esetében állapítottunk meg meticillin-rezisztenciát, amelyek közül az egyik izolátum eddig még nem ismert szekvencia típusba, míg a másik MRSA törzs az ST398 típusba tartozott, amely a mezőgazdasági haszonállatokból izolált MRSA törzsek leggyakoribb típusa az EU/EGT területén.

(Az „MRSA” rövidítést köznapi szóhasználatban, de esetenként a szakirodalomban is gyakran a „multirezisztens *Staphylococcus aureus*” megjelölésére használják. A szerzők kéziratában - helyesen a meticillin-rezisztens kórokozót jelölik így. A Szerk.)

<sup>a</sup> Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Élelmiszertudományi Intézet

<sup>b</sup> BIOMI Kft.

<sup>c</sup> Pázmány Péter Katolikus Egyetem

<sup>d</sup> WESSLING Hungary Kft.

<sup>e</sup> Állatorvostudományi Egyetem

\* Levelező szerző: [horvath.brigitta920108@gmail.com](mailto:horvath.brigitta920108@gmail.com)

**HORVÁTH Brigitta**

**PELES Ferenc Dr.**

**GASPARIKNÉ REICHARDT Judit Dr.**

**POCKLÁN Edit**

**SIPOS Rita Dr.**

**ERŐS Ágnes**

**PETRÓCZKI Flóra Mária**

**SZÚCS Kata Dorina**

**ALBERT Ervin**

**MICSINAI Adrienn Dr.**

[horvath.brigitta920108@gmail.com](mailto:horvath.brigitta920108@gmail.com)

[pelesf@agr.unideb.hu](mailto:pelesf@agr.unideb.hu)

[reichardt.judit@wessling.hu](mailto:reichardt.judit@wessling.hu)

[pocklan.edit@wessling.hu](mailto:pocklan.edit@wessling.hu)

[sipos.rita@biomi.hu](mailto:sipos.rita@biomi.hu)

[eros.agnes@biomi.hu](mailto:eros.agnes@biomi.hu)

[petroczki.flora@agr.unideb.hu](mailto:petroczki.flora@agr.unideb.hu)

[szucs.katad@gmail.com](mailto:szucs.katad@gmail.com)

[albert.ervin@univet.hu](mailto:albert.ervin@univet.hu)

[micsinai.adrienn@wessling.hu](mailto:micsinai.adrienn@wessling.hu)

<https://orcid.org/0000-0002-7861-0824>

<https://orcid.org/0000-0002-9226-3777>

<https://orcid.org/0000-0003-3000-6158>

<https://orcid.org/0000-0001-8942-0674>

<https://orcid.org/0000-0002-1770-769X>

<https://orcid.org/0000-0001-7258-615X>

<https://orcid.org/0000-0001-9878-4656>

<https://orcid.org/0000-0002-8728-3714>

<https://orcid.org/0000-0002-2244-7538>

<https://orcid.org/0000-0001-5745-4589>

## 2. Bevezetés és irodalmi áttekintés

Az antibiotikum rezisztens mikroorganizmusok által okozott nozokómiális infekciók (kórházhygiénés fertőzések – a szerk.) száma minden országban növekedést mutat, ezáltal egyre nagyobb kihívás elé állítva az egészségügyi ellátórendszert [1, 2]. A helyzetet tovább súlyosbítja az a tény, hogy az antibiotikum rezisztens *Staphylococcus* fajok már nem csak a közösségekben és az egészségügyben, hanem az intenzív állattartásban, ezáltal az élelmiszerláncban is megjelentek [3].

A *Staphylococcus* fajokban az antibiotikum rezisztenciával és virulenciával kapcsolatos gének a mobilis genetikai elemekben (MGE) találhatóak, mint például a kromoszóma kazettákban, patogénitási szigeteken, plazmidokban vagy transzpozonokban [4]. A methicillinnel szembeni rezisztenciáért a *mecA* gén felelős: a gén egy módosított penicillin-kötő fehérjét kódol, amely csökkenti a legtöbb béta-laktám antibiotikum, így a penicillin és a methicillin kötődési affinitását. A *mecA* gén a *Staphylococcus* kromoszóma kazettán (SSC*mec*) található, amely egy MGE csoport és csak a *Staphylococcus* fajokban található meg [5]. A *mecA* gén *Staphylococcus* fajok közötti átvitelének mechanizmusa nem ismert, azonban bizonyítékok támasztják alá a horizontális géntranszferet a koaguláz-pozitív és koaguláz-negatív *Staphylococcus* fajok között [6].

A methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) törzsek élelmiszerláncban előforduló jelenlétéről már több tanulmány beszámolt. Szerzőik egy része állati eredetű élelmiszermintákból, másik része pedig nyers húsmintákból (sertés, hal, baromfi) izolált törzsek vizsgálatát végezte el. Hollandiában 2009-ben 2217 különböző élelmiszermintát vizsgáltak meg, amelynek a 12%-a MRSA törzsnek bizonyult [7], míg egy dániai vizsgálat során 153 sertéshúsmintának a 4,6%-a, az importált 173 sertéshúsmintának pedig a 7,5%-a volt fertőzött MRSA törzssel [8]. Németországban nyers tejből, sertéshúsból, pulykahúsból és brojler csirkehúsból is azonosítottak MRSA törzseket [9]. Magyarországon egy tehenészeti telep 595 egyedi tejmintájából 27 db MRSA izolátumot azonosítottak [10], egy másik vizsgálatban 42 telep 626 *S. aureus* izolátuma közül csak 4 törzs bizonyult methicillin rezisztensnek [11]. Ezekon túl azonban más élelmiszerkategóriából származó és fogyasztásra kész élelmiszerekből eddig nem vizsgálták az MRSA jelenlétét. A törzsek molekuláris tipizálási eredményei rámutattak arra, hogy az MRSA számos típusa jelen van az élelmiszerláncban a különböző országokban [12], azonban a leggyakrabban a CC398-as típus fordult elő, amely az EU és az EGT területén a mezőgazdasági haszonállatokból izolált MRSA törzsek 85%-át teszi ki [13, 14, 7,15].

A további methicillin-rezisztens *Staphylococcus* (MRS) fajok előfordulását az élelmiszerekben azonban már kevesebb tanulmány vizsgálta. Nigériában 255 tradicionális ételből származó izolátumból 13 *Staphylococcus* faj (*S. xylosus*, *S. epidermidis*, *S. simulans*) mutatott methicillin-rezisztenciát [16]. Egy Lengyelországban végzett tanulmány során 58 készételből izolált törzsből 33 *Staphylococcus* törzs (*S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. hycus*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*) mutatott rezisztenciát legalább egy fajta antibiotikummal szemben [17].

Az Európai Unióban az élelmiszerekből és haszonállatokból izolált *Staphylococcus* törzsek antibiotikum rezisztenciájának ellenőrzése jelenleg önkéntes, ezért 2016-ban csak Németország, Svájc, Dánia és Spanyolország jelentett ezzel kapcsolatos információt. Az MRSA előfordulási gyakorisága országonként eltérő volt, ám az összehasonlítás során figyelembe kell venni, hogy a vizsgálatokat eltérő állatfajokból, húsból és húskészítményekből izolált törzseken végezték el [18]. A humán fertőzések kis hányada vezethető vissza a CC398-as típusú MRSA törzsekre és azok is legfőképp szakmai expozíciókra korlátozódnak, mint az állatgyógyászat és az intenzív állattartás. Ennek ellenére a CC398-as típusú MRSA törzsekben kimutatható virulencia faktorok lehetővé teszik a magas patogenitást, így a folyamatos revízió mind az állatokban, mind az élelmiszerekben elengedhetetlen [19]. A felügyelet szükségességét az egyéb *Staphylococcus* fajok antibiotikum rezisztenciájának esetleges fennállása is indokolja, amely lehetőséget nyújt a rezisztencia terjedésére, és veszélyt jelent a fogyasztók egészségére.

A sikeres felügyeleti rendszer elengedhetetlen feltétele, hogy egy egységes, gazdasági szempontból is elfogadható, gyors és megbízható módszer álljon rendelkezésre a mikroorganizmusok faji szintű azonosításában és antibiotikum rezisztencia meghatározásában, amelynek ígéretes alappillére lehet a fehérje azonosításon alapuló (peptide mass fingerprint) mátrix-asszisztált lézer deszorpciós, ionizációs, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria (MALDI-TOF-MS). A 2000-es évek kezdetén számos tanulmány számolt be olyan specifikus fragment ionokról, amelyek lehetővé teszik az antibiotikum rezisztens *Staphylococcus* törzsek gyors azonosítását. A legtöbbet vizsgált biomarker a 2414 m/z értékű fragment ion volt, amelynek megjelenése a tömegspektrumban az MRSA törzsekre jellemző *psm-mec* expressziójával korrelál [20]. A detektáláshoz és diszkriminációhoz a 2414 m/z értékű fragment ion alkalmazhatóságát több tanulmány is igazolta [21, 22].

Az MRSA törzsek biomarkereinek vizsgálatán kívül más tanulmányok további *Staphylococcus* fajok methicillin-rezisztencia specifikus fragment ion csúcsait elemezték. Egy korábbi cikkben két specifikus fragment ion-értéket határoztak meg: a 7239 m/z értékű ion fragment-csúcsot, amely a methicillin-rezisztens *S. epidermidis* és a 9674 m/z fragment-ion csúcsot, amely a methicillin-rezisztens *S. haemolyticus* biomarkere [23].

Saját kísérleteink célja az élelmiszerekből izolált *Staphylococcus* törzsek methicillin rezisztenciájának vizsgálata klasszikus mikrobiológiai, molekuláris biológiai módszerekkel és MALDI-TOF-MS technikával, továbbá az antibiotikum rezisztens törzsek multilokus szekvencia tipizálása volt (MLST) a törzsek epidemiológiai vizsgálata céljából.

### 3. Vizsgálati anyag és módszer

#### 3.1. Gyűjtött izolátumok és tenyésztési körülmények

A WESSLING Hungary Kft. Mikrobiológiai laboratóriumában a 2019. augusztus és 2020. szeptember közötti időszakban az MSZ EN ISO 6888-1:2008 szabvány előírásai alapján izolált 77 *Staphylococcus* izolátumot vizsgáltunk. Az izolátumokat 37 °C-on, 24±1 órán keresztül Baird-Parker (Biokar, Franciaország) szelektív táptalajon tenyésztettük és a *Staphylococcus*okra jellemző kolóniákat Columbia véres agarra (Neogen, UK) oltottuk át (37 °C, 24±1 óra). A tenyésztés során 47 törzs mutatott pozitív koaguláz reakciót, míg 30 izolátum koaguláz-negatívnak bizonyult, amelyet latex agglutinációs gyorstesztel (PASTOREX™ STAPH-PLUS) is igazoltunk. Az izolátumokat nyers húsból, húskészítményekből és fogyasztásra készételekből gyűjtöttük: baromfi (n=14), marha (n=5), sertés (n=42), vad (n=1), hal (n=1), tejtermék (n=3), készételek (n=3), zöldségek (n=2) és szárzészta (n=6).

#### 3.2. Izolátumok azonosítása MALDI-TOF-MS technikával

A gyűjtött 77 izolátum azonosítását Bruker Microflex LT MALDI-TOF tömegspektrométerrel és a MALDI BioTyper 3.1 (Bruker Daltonics) szoftverrel végeztük el. Hangyasavas szuszpendálási protokollt alkalmaztunk, amely során Columbia véres agarról egy önálló telepet vettünk fel egy steril kacs segítségével, majd 40 µl hangyasavban szuszpendáltunk el. A szuszpenzióhoz 40 µl acetonitrilt adtunk, amelyből a lemez egyik pozíciójára 1 µl-t cseppentettünk fel. A csepp beszáradását követően a mintákra 1 µl α-HCCA (10 mg/ml α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid) mátrix oldatot vittünk fel és a mintát ismét hagytuk beszáradni. Valamennyi minta esetében 6 párhuzamos mérést végeztünk.

Az izolátumok azonosítása során MALDI Biotyper 3.1 szoftvert alkalmaztunk, amely a kapott tömegspektrumokat az adatbázisában szereplő referencia tömegspektrumokhoz hasonlítja és egy megfelelési faktort (score) számít ki. 2,300 – 3,000 log score érték esetén az azonosság igen valószínű. Ekkora log score érték esetén a faj azonosítottnak tekinthető. Amennyiben 2,000 – 2,299 közötti log score értéket kapunk, az azonosság kisebb, így ez esetben csak a mikroorganizmus nemzetsége tekinthető azonosítottnak. 1,700 – 1,999 log score érték között a nemzetség (genus) azonosítása sem tekinthető megfelelően biztosnak. Ha az értékelő szoftver 0,000 – 1,699 közötti log score értéket ad meg, az azonosítást sikertelennek kell tekinteni. A vizsgálatba bevont koaguláz-pozitív *Staphylococcus* törzsek azonosítását korábban végeztük el [24].

#### 3.3. Antibiotikum érzékenységi vizsgálat

##### 3.3.1. Methicillin-rezisztencia specifikus csúcsok vizsgálata MALDI-TOF-MS módszerrel

A kapott tömegspektrumokat a flexAnalysis 3.4 szoftverbe (Bruker Daltonics) exportáltuk és elvégeztük a tömegspektrumok manuális elemzését és összehasonlítását. A tömegspektrumok simítását a Savitzky–Golay szűrővel, az alapvonal korrekcióját pedig a TopHat algoritmussal végeztük el. Az elemzés során a methicillin-rezisztencia (MR) specifikus fragment ionok jelenlétét vizsgáltuk (1. táblázat).

1. táblázat. A vizsgálatban tesztelt methicillin-rezisztencia (MR) specifikus csúcsok

Faj	MR specifikus fragment ion	Irodalmi hivatkozás
<i>S. aureus</i>	2414 m/z	[20]
<i>S. aureus</i>	2414 m/z	[22]
<i>S. aureus</i>	2414 m/z	[21]
<i>S. epidermidis</i>	7239 m/z	[23]
<i>S. haemolyticus</i>	9674 m/z	[23]

### 3.3.2. Korongdiffúziós módszer

A törzsek antibiotikum-rezisztenciájának vizsgálata során a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) által meghatározott előírásoknak (2019) megfelelően jártunk el [25]. A 0,5 McFarland egységnyi baktérium-szuszpenziót Mueller-Hinton agar (Oxoid, UK) felületére szélesztettük, majd a táptalaj felületére helyeztük a Cefoxitin 30 µg korongokat. A törzseket 37 °C-on, 18 órán át inkubáltuk. Az MRSA törzsek esetében a feltisztulási zóna referencia tartománya 6-19 mm volt, míg *mecA* negatív fajoknál 20-32 mm.

### 3.3.3. Szelektív differenciáló agar

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok során továbbá a CHROMagar MRSAII szelektív differenciáló táptalajt (BD, UK) alkalmaztunk, amely a meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* fajok kimutatására szolgál. Az izolátumokat 37 °C-on 24-48 órán keresztül inkubáltuk aerob körülmények között. MRSA baktériumnak tekintettük azokat a törzseket, amelyek morfológiailag *Staphylococcus*okhoz hasonló mályvaszínű telepeket képeztek. A korongdiffúziós (Cefoxitin 30 µg) módszert és az MRSA CHROMagar vizsgálatot minden élelmiszerből izolált törzs (n=77) esetében kétszer ismételtük meg. A vizsgálatok során pozitív kontrollként az ATCC 33591 referencia MRSA törzset, negatív kontrollként pedig az ATCC 29213 MSSA törzset használtuk.

### 3.3.4. *mecA* génkomplex

A *mecA* gén kimutatásának vizsgálatát a Dán Nemzeti Élelmiszertudományi Intézet (National Food Institute – NFI) 2012-ben kiadott protokollja alapján végeztük el [26]. A vizsgálat során pozitív kontrollként az ATCC 43300 MRSA törzset, míg negatív kontrollként az ATCC 29213 MSSA törzset használtuk. A baktériumokból genomi DNS-t izoláltunk, majd a *mecA* génszakaszt PCR segítségével felszaporítottuk. Az alkalmazott primereket a **2. táblázat** tartalmazza.

2. táblázat. A *mecA* gén felszaporításához alkalmazott primerek

Primer név	Primer szekvencia
<i>mecA</i> _fwd	5'- GGGATCATAGCGTCATTATTC-3'
<i>mecA</i> _rev	5'- AACGATTGTGACACGATAGCC-3'

## 3.4. A meticillin-rezisztens *Staphylococcus* törzsek MLST vizsgálata

THOMAS és munkatársai [27] tanulmánya alapján a baktériumokból genomi DNS-t izoláltunk, majd a 7 db *Staphylococcus aureus* fajra specifikus génszakaszt PCR segítségével felszaporítottuk (**3. táblázat**). Meghatároztuk a megtisztított PCR termékek nukleotid sorrendjét majd a szekvencia adatokat *BioNumerics* 7.6 szoftverben értékeltük.

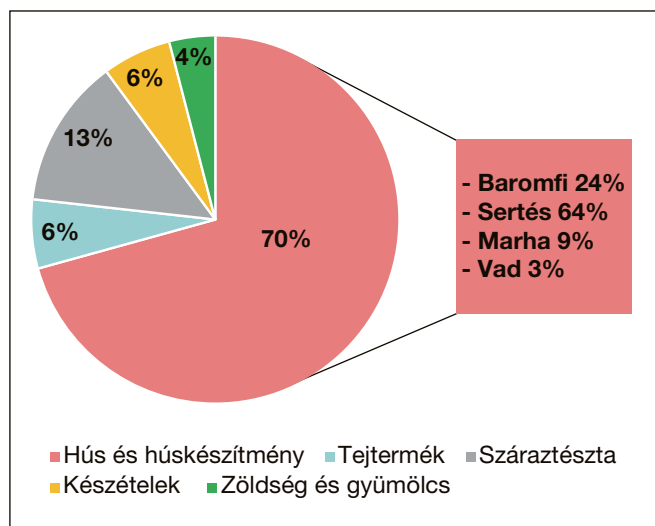
3. táblázat. MLST módszer során alkalmazott gének és a felszaporításukhoz használt primerek adatai

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

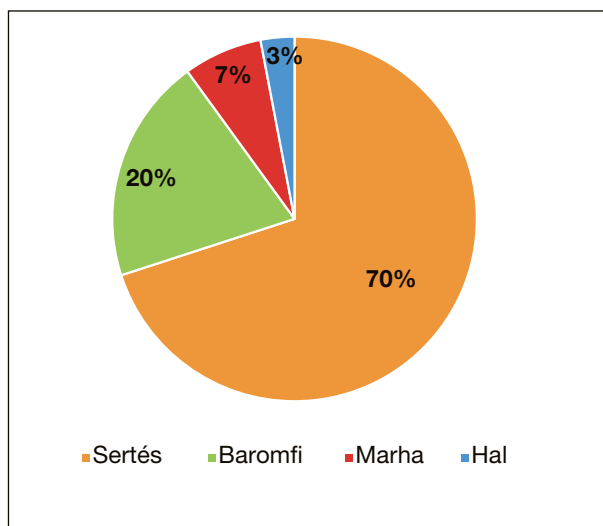
## 4. Eredmények

### 4.1. Az izolált törzsek azonosítási eredményei

A MALDI-TOF-MS vizsgálat során minden koaguláz-pozitív *Staphylococcus* (CPS) törzs (n=47) *S. aureus* fajnak bizonyult (**4. és 6. táblázat**). A koaguláz-negatív *Staphylococcus* (CNS) törzsek esetében pedig 8 különböző fajt (*S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. pasteurii*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. chromogenes*, *S. piscifermentans*, *S. haemolyticus*) azonosítottunk (**4. és 7. táblázat**). A CNS (n=30) izolátumok 30%-a *S. warneri* fajnak, míg 23%-a *S. pasteurii* fajnak bizonyult. A *S. aureus* törzsek 70%-át, míg a CNS törzsek mindegyikét hús és húskészítményekből izoláltuk (**1. és 2. ábra**). A *S. aureus* törzsek esetében a hús és húskészítmények 64%-a, míg a CNS törzsek 70%-a sertésből származott. A hús és húskészítményeken belül, a baromfiból és marhából származó izolátumok megoszlása közel azonos volt.



1. ábra. A *S. aureus* törzsek megoszlása élelmiszercsoportonként



2. ábra. A CNS törzsek megoszlása élelmiszercsoportonként

Az izolátumok átlag azonosítási log score értékeit és azok szórását a **4. táblázat** foglalja össze. A *S. aureus* izolátumok átlag azonosítási log score értéke meghaladta a 2,400-et. A legalacsonyabb log score érték 2,304 volt, azonban még ebben az esetben is biztonságosnak tekinthető az azonosítás. A CNS izolátumok vizsgálata során, minden fajt 2,300 log score érték felett azonosítottunk és a szórás egyik esetben sem haladta meg a 0,1 értéket.

4. táblázat. Azonosított koaguláz-pozitív és -negatív *Staphylococcus* fajok azonosítási log score értékei

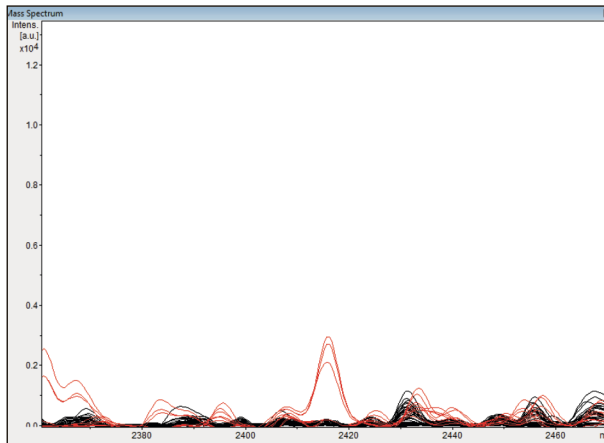
Faj	Azonosítási log score érték átlaga	Legalacsonyabb log score érték	Legmagasabb log score érték	Log score értékek szórása
<i>S. aureus</i> (n=47)	2,415	2,304	2,571	0,072
<i>S. xylosus</i> (n=1)	2,412	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i> (n=3)	2,406	2,395	2,415	0,010
<i>S. pasteurii</i> (n=7)	2,387	2,325	2,462	0,050
<i>S. epidermidis</i> (n=4)	2,348	2,304	2,396	0,038
<i>S. warneri</i> (n=9)	2,365	2,324	2,406	0,028
<i>S. chromogenes</i> (n=1)	2,372	-	-	-
<i>S. haemolyticus</i> (n=4)	2,353	2,307	2,413	0,054
<i>S. piscifermentans</i> (n=1)	2,318	-	-	-

### 4.2. A MALDI-TOF-MS technikával meghatározott methicillin-rezisztencia eredményei

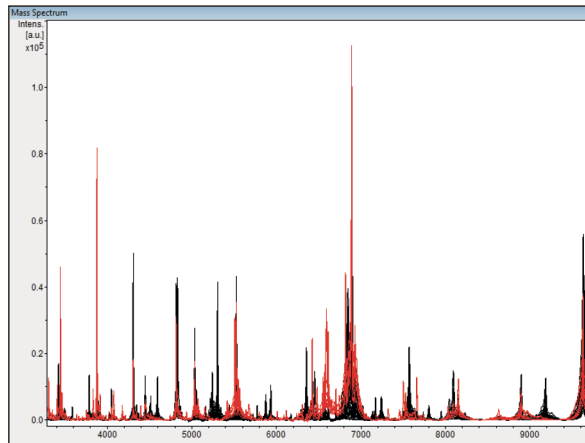
Az izolátumokból nyert tömegspektrumok elemzése során 3 antibiotikum-rezisztencia specifikus csúcsot vizsgáltunk meg. A 2414 m/z csúcs a *mecA* gén egyik fehérjeterméke [28], ezért ennek a csúcsnak a jelenlétét illetve hiányát minden törzs esetében megvizsgáltuk. A 7239 m/z csúcs detektálhatóságát csak a *S. epidermidis* fajokban, míg a 9674 m/z csúcs jelenlétét/hiányát csak a *S. haemolyticus* fajokban vizsgáltuk a csúcsok fajspecifitása miatt.

A 2414 m/z csúcsot a 77 izolátum közül, két *S. aureus* törzsben detektáltuk, amelyek közül az egyik libamájból (SA-17) a másik sertés tarjából (SA-47) származik. A további 75 izolátum esetében ez a csúcs még alacsony intenzitással sem jelent meg (5. táblázat). Az elemzés során a methicillin-rezisztensnek bizonyult két *S. aureus* törzset pirossal, míg a többi, methicillin-rezisztencia specifikus csúcsot nem tartalmazó *S. aureus* törzsek tömegspektrumait feketével jelöltük (3. és 4. ábra).

A 7239 m/z egyik *S. epidermidis* törzsben (n=4) sem volt detektálható és a 9674 m/z csúcs a 4 *S. haemolyticus* faj egyikében sem jelent meg.



3. ábra. A 2414 m/z átmenet tömegspektruma



4. ábra. A 47 Staphylococcus törzs tömegspektruma

5. táblázat. Specifikus ion fragment-értékek előfordulási gyakorisága az élelmiszerekből izolált *Staphylococcus* törzsekben

Faj	Specifikus ion fragment-értékek előfordulási gyakorisága		
	2414 m/z	7239 m/z	9674 m/z
<i>S. aureus</i> (n=47)	4,3%	-	-
<i>S. xylosus</i> (n=1)	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i> (n=3)	-	-	-
<i>S. pasteurii</i> (n=7)	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> (n=4)	-	-	-
<i>S. warneri</i> (n=9)	-	-	-
<i>S. chromogenes</i> (n=1)	-	-	-
<i>S. haemolyticus</i> (n=4)	-	-	-
<i>S. piscifermentans</i> (n=1)	-	-	-

#### 4.3. A korongdiffúziós módszer és az MRSA CHROMagar szelektív differenciáló agar eredményei

A 77 törzs vizsgálata során 75 törzs esetében a feltisztulási zóna átmérője 23-29 mm közé esett. Egy libamájból izolált törzs (SA-17) feltisztulási zónája 9 mm, egy sertés tarjából izolált törzs (SA-47) feltisztulási zónája pedig 17 mm átmérőjű volt és ugyanezen törzsek mályvaszínű telepeket képeztek az MRSA CHROMagar szelektív differenciáló táptalajon is (6. és 7. táblázat).

6. táblázat. Az élelmiszerekből azonosított *S. aureus* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálatok eredményei

Élelmiszer kategória	Azonosító	Élelmiszer megnevezése	log score érték	Azonosítás eredménye	Feltisztulási zóna (mm)	MRSA Chromagar	<i>mecA</i> gén
Tejtermék	SA-1	Trappista sajt	2,458	<i>S. aureus</i>	24	-	-
	SA-10	Trappista sajt	2,440	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-18	Tejes desszert	2,513	<i>S. aureus</i>	25	-	-
Szárzészta	SA-2	Szárzészta	2,476	<i>S. aureus</i>	25	-	-
	SA-49	Szárzészta	2,308	<i>S. aureus</i>	28	-	-
	SA-7	Szárzészta	2,304	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-21	Szárzészta	2,486	<i>S. aureus</i>	27	-	-
	SA-22	Szárzészta	2,448	<i>S. aureus</i>	24	-	-
	SA-11	Szárzészta	2,429	<i>S. aureus</i>	25	-	-
Hús	SA-12	Csirkecomb	2,465	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-13	Csirkecomb	2,345	<i>S. aureus</i>	27	-	-
	SA-16	Pácolt csirke	2,332	<i>S. aureus</i>	24	-	-
	SA-44	Egész kacs	2,401	<i>S. aureus</i>	28	-	-
	SA-17	Libamáj	2,447	<i>S. aureus</i>	9	+	+
	SA-20	Kacsatál	2,432	<i>S. aureus</i>	24	-	-
	SA-28	Kacs comb	2,353	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-29	Kacs tepertő	2,571	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-4	Császár szalonna	2,319	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-31	Bacon	2,546	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-5	Kolbász	2,477	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-6	Karaj	2,366	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-32	Karaj	2,466	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-25	Kolbász	2,429	<i>S. aureus</i>	25	-	-
	SA-33	Karaj	2,329	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-24	Lapocka	2,343	<i>S. aureus</i>	28	-	-
	SA-34	Karaj	2,350	<i>S. aureus</i>	29	-	-
	SA-9	Lapocka	2,425	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-35	Lapocka	2,500	<i>S. aureus</i>	24	-	-
	SA-36	Lapocka	2,387	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-37	Lapocka	2,429	<i>S. aureus</i>	24	-	-
	SA-15	Tepertő	2,342	<i>S. aureus</i>	25	-	-
	SA-38	Sütnivaló kolbász	2,474	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-02	Lapocka	2,383	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-01	Kolbász	2,395	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-39	Csülök	2,562	<i>S. aureus</i>	24	-	-
	SA-40	Csülök	2,516	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-41	Fej	2,403	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-47	Tarja	2,354	<i>S. aureus</i>	17	+	+
	SA-3	Marhahús	2,333	<i>S. aureus</i>	29	-	-
	SA-8	Marhahús	2,484	<i>S. aureus</i>	25	-	-
	SA-48	Belsőség	2,362	<i>S. aureus</i>	28	-	-
	SA-42	Nyúlhús	2,371	<i>S. aureus</i>	24	-	-

Készételek	SA-43	Hamburger hús	2,382	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-50	Grill csirke	2,305	<i>S. aureus</i>	28	-	-
	SA-45	Csokoládé	2,339	<i>S. aureus</i>	23	-	-
Zöldségek	SA-46	Friss saláta mix	2,525	<i>S. aureus</i>	28	-	-
	SA-27	Sárgarépa pástétom	2,421	<i>S. aureus</i>	25	-	-

7. táblázat. Az élelmiszerekből azonosított koaguláz-negatív *Staphylococcus* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálatok eredményei

Élelmiszer kategória	Azonosító	Élelmiszer megnevezése	log score érték	Azonosítás eredménye	Feltisztulási zóna (mm) (cefoxitin)	MRSA Chromagar
Baromfi	061SH	Tojás	2,384	<i>S. haemolyticus</i>	24	-
	062SH	Tojás	2,307	<i>S. haemolyticus</i>	26	-
	178SE	Csirkemell	2,340	<i>S. epidermidis</i>	26	-
	392SP	Kacsa tepertő	2,318	<i>S. piscifermentans</i>	26	-
	473SE	Tojáskrém	2,353	<i>S. epidermidis</i>	25	-
	529SW	Pástétom	2,324	<i>S. warneri</i>	26	-
Sertés	573SX	Tepertőkrém	2,412	<i>S. xyloso</i>	24	-
	377SS	Sertésárja	2,395	<i>S. saprophyticus</i>	24	-
	378SS	Sertésárja	2,408	<i>S. saprophyticus</i>	24	-
	051SP	Sertéslapocka	2,354	<i>S. pasteurii</i>	26	-
	527SE	Darált hús	2,304	<i>S. epidermidis</i>	23	-
	052SP	Sertéslapocka	2,462	<i>S. pasteurii</i>	25	-
	528SE	Darált hús	2,396	<i>S. epidermidis</i>	23	-
	530SW	Darált hús	2,364	<i>S. warneri</i>	24	-
	426SW	Sertéslapocka	2,348	<i>S. warneri</i>	24	-
	868SS	Sertésárja	2,415	<i>S. saprophyticus</i>	28	-
	911SW	Darált hús	2,371	<i>S. warneri</i>	24	-
	393SW	Sertéslapocka	2,403	<i>S. warneri</i>	24	-
	427SW	Sertésárja	2,362	<i>S. warneri</i>	23	-
	976SP	Sertéslapocka	2,325	<i>S. pasteurii</i>	24	-
	050SP	Sertéslapocka	2,397	<i>S. pasteurii</i>	26	-
	051SP	Sertésárja	2,392	<i>S. pasteurii</i>	25	-
	052SW	Sertésárja	2,334	<i>S. warneri</i>	26	-
	472SP	Darált hús	2,341	<i>S. pasteurii</i>	26	-
	065SW	Sertéskaraj	2,375	<i>S. warneri</i>	23	-
	510SH	Tepertőkrém	2,413	<i>S. haemolyticus</i>	26	-
512SH	Sertésárja	2,309	<i>S. haemolyticus</i>	24	-	
Marha	435SW	Marhahúspogácsa	2,406	<i>S. warneri</i>	24	-
	434SC	Marha nyak	2,372	<i>S. chromogenes</i>	28	-
Hal	979SP	pontyszelet	2,436	<i>S. pasteurii</i>	24	-

#### 4.4. *mecA* gén kimutatás eredményei

A MALDI-TOF-MS vizsgálatok, a korongdiffúziós módszer és az MRSA szelektív, differenciáló táptalaj eredményei alapján kiderült, hogy a libamájából és sertés tarjából izolált *S. aureus* törzsek (SA-17, SA-47) methicillin-rezisztenciát hordoznak, amelyet a két törzsben kimutatható, a PBP2a szintéziséért felelős *mecA* gén erősített meg (6. táblázat).

#### 4.5. Az MRSA törzsek MLST típusa

A vizsgálat során elvégeztük a két MRSA törzs MLST tipizálását is, amely során a PubMLST honlapon (<https://pubmlst.org/saureus/>) elérhető adatbázisban szereplő adatokat használtuk. A BioNumerics 7.6 szoftver a



két MRSA törzs közül csak a sertés tarjából izolált törzs esetében tudta hozzárendelni a szekvencia típust. A libamájából izolált törzs egy eddig még nem ismert szekvencia típusba, míg a sertés tarjából izolált törzs a 398-as szekvencia típusba tartozott (**8. táblázat**).

8. táblázat. Az élelmiszerekből izolált MRSA törzsek MLST típusa

Élelmiszer megnevezése	Azonosító	Faj	„Repeat succession” kód	MLST típus
Sertésstarja	SA-47	<i>S. aureus</i>	08-16-02-25-34-24-25	ST398
Libamáj	SA-17	<i>S. aureus</i>	09-02-16-34-17-34-16-34	Ismeretlen

## 5. Összefoglalás és következtetés

A vizsgálat során különböző élelmiszer mátrixokból 77 *Staphylococcus* izolátumot gyűjtöttünk az MSZ EN ISO 6888-1:2008 szabványban leírt módszerek alapján. A szabvány ugyan lehetővé teszi a koaguláz-pozitív és koaguláz-negatív *Staphylococcus* fajok elkülönítését, azonban a faji identifikálást nem, amely a fajok eltérő virulencia faktorai és patogenitása szempontjából számottevő. Az élelmiszerekből izolált 47 koaguláz-pozitív és 30 koaguláz-negatív *Staphylococcus* törzs azonosítását MALDI-TOF-MS technikával végeztük el, magas azonosítási log score értékekkel. Emellett a kapott tömegspektrumok elemzésével, korábbi tanulmányokban meghatározott methicillin-rezisztencia specifikus ion fragment-értékek alapján két *S. aureus* törzs esetében methicillin-rezisztenciát állapítottunk meg, amelyet korongdiffúziós módszerrel, szelektív differenciálós agarral és a *mecA* gén kimutatásával igazoltunk. A specifikus ion fragment értékeknek köszönhetően jelentősen csökkenthető a diagnosztikai idő, amely gazdasági és terápiás szempontból sem elhanyagolható. Azt azonban figyelembe kell vennünk, hogy az MRSA törzsek nagy variabilitásának köszönhetően ezeknek az ion fragment értékeknek a szenzitivitása és specifitása nem 100%-os, így megerősítő vizsgálatok elvégzése szükséges.

Az élelmiszerekből izolált két MRSA törzsnek elvégeztük a multilókusz szekvencia tipizálását (MLST), a törzsek epidemiológiai vizsgálata céljából. A sertésarjból származó izolátum az ST398 típusba tartozott, amely a mezőgazdasági haszonállatokból izolált MRSA törzsek leggyakoribb típusa az EU/EGT területén. Figyelembe véve azonban az ST398-as típusú törzsek specifikus gazdaszervezet adaptációs képességeit, miszerint azok nem csak sertésekben, hanem más állatfajokban és a humán szervezetben is képesek megtapadni, a kontamináció és a fertőződés számos módon létrejöhet az élelmiszer-feldolgozás technológiai lépései során is.

Tekintve, hogy az élelmiszerekből izolált 47 *S. aureus* törzs közül 2 törzs is methicillin-rezisztensnek bizonyult, e tény igazolja a globálisan növekvő antibiotikum-rezisztencia okozta veszélyeket, ezáltal a helyzet súlyosságát és aktualitását is jelzi.

## 6. Köszönetnyilvánítás

A tanulmány a WESSLING Hungary Kft., a BIOMI Kft. és az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-19-3-III kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának szakmai támogatásával készült.

## 7. Irodalom

- [1] Böröcz, K. (2001): A magyarországi nosocomialis MRSA járványok tapasztalatai (1993-2000). Epidemiológiai Információs Hetilap. 8. (10-11).
- [2] 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).
- [3] 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.
- [4] Lim, D., Strynadka, N. C. J. (2002): Structural basis for the  $\beta$ -lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Structural Biology*. 9 (11), pp. 870-876. <https://doi.org/10.1038/nsb858>
- [5] Ito, T., Katayama, Y., Hiramatsu, K. (1999): Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother*. 43 (6), pp. 1449-58. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.6.1449>

- [6] Wielders, C. L., Vriens, M. R., Brisse, S., De Graaf-Miltenburg, L. A., Troelstra, A., Fleer, A., Schmitz, F. J., Verhoef, J., Fluit, A. C. (2001): In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus* [corrected]. *Lancet*. 26; 357 (9269), pp. 1674-1675. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04832-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04832-7)
- [7] 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), pp. 1375-1382. <https://doi.org/10.1007/s10096-009-0795-4>
- [8] 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), pp. 246-250. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.023>
- [9] Argudín, M. A., Tenhagen, B. A., Fetsch, A., Sachsenröder, J., Käsbohrer, A. (2011): Virulence and resistance determinants of German *Staphylococcus aureus* ST398 isolates from nonhuman sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 77 (9), pp. 3052-3060 <https://doi.org/10.1128/AEM.02260-10>
- [10] 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), pp. 630-632. <https://doi.org/10.3201/eid1304.060833>
- [11] Albert, E., Sipos, R., Jánosi, Sz., Kovács, P., Kenéz, Á., Micsinai, A., Noszály, Zs., Biksi, I. (2020): Occurrence and characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*. 68 (3) pp. 236-241. <https://doi.org/10.1556/004.2020.00040>
- [12] Wendlandt, S., Schwarz, S., Silley, P. (2013): Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Food-Borne Pathogen? *Annual Review of Food Science and Technology*. 4, pp. 117-139. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182653>
- [13] 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), pp. 124-129. <https://doi.org/10.1128/AEM.02803-14>
- [14] Fluit, A.C. (2012): Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*. 18 (8), pp. 735-744. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03846.x>
- [15] 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), pp. 11-17. <https://doi.org/10.1093/cid/cit228>
- [16] Fowoyo, P. T. - Ogunbanwo, S. T. (2017): Antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from Nigerian traditional fermented foods. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16 (4), pp. 2-7. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0181-5>
- [17] Chaje, W., Zadernowska, A. C.-W., Nalepa, B., Sierpinska, M., - Łaniewska-Trokenheim, L. (2015): Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin e Phenotypic and genotypic antibiotic resistance. *Food Microbiology*, 46, pp. 222-226. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.001>
- [18] 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), pp. 5182. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5182>
- [19] Aires-De-Sousa, M. (2016): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. *Clinical Microbiology and Infection*. 23, pp. 373-380. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.002>

- [20] 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), pp. 1018-1023. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.07.005>
- [21] Alksne, L., Makarova, S., Avsejenko, J., Cibrovskā, A., Trofimova, J., Valciņa, O. (2020): Determination of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis by MALDI-TOF-MS in clinical isolates from Latvia. *Clinical Mass Spectrometry*. 16, pp. 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.clinms.2020.03.001>
- [22] 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.msac1.org/view\\_abstract/MSACL\\_2017\\_EU.php?id=305](https://www.msac1.org/view_abstract/MSACL_2017_EU.php?id=305) Hozzáférés: 2021.01.08.
- [23] 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 pp. 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11597-z>
- [24] Horvath, B., Peles, F., Szél, A., Sipos, R., Erős, Á., Albert, E., Micsinai, A. (2020): Molecular typing of foodborne coagulase-positive Staphylococcus isolates identified by MALDI-TOF-MS. *Acta Alimentaria, An International Journal of Food Science*. 49 (3), pp. 307-313. <https://doi.org/10.1556/066.2020.49.3.9>
- [25] Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2019): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eighteenth Informational Supplement M100- S18. Wayne, PA, USA: CLSI.
- [26] 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/CustomData/Files/Folders/21-protocols/279\\_pcr-spa-pvl-meca-mecc-sept12.pdf](https://www.eurl-ar.eu/CustomData/Files/Folders/21-protocols/279_pcr-spa-pvl-meca-mecc-sept12.pdf) Hozzáférés: 2021.02.03.
- [27] 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), pp. 616-619. <https://doi.org/10.1128/JCM.01934-06>
- [28] 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), pp. 1018-1023. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.07.005>