

**TÜNETMENTES KOAGULÁZ POZITÍV  
STAPHYLOCOCCUS HORDOZÁS EMBEREKBEN ÉS  
ÁLLATOKBAN**

**Doktori tézis**

**Dr. Sahin-Tóth Judit**

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola



- Témavezető: Dr. Dobay Orsolya, PhD, egyetemi docens
- Hivatalos bírálók: Dr. Szabó Györgyi, PhD, egyetemi adjunktus  
Dr. Tóth István, DSc, ny. tudományos tanácsadó
- Komplex vizsga bizottság elnöke: Prof. Dr. Cseh Károly, DSc, egyetemi tanár
- Komplex vizsga bizottság tagjai: Dr. Tóth Ákos, PhD  
Dr. Molnár Miklós, PhD, egyetemi docens

Budapest

2022

## Bevezetés

A koaguláz-pozitív *Staphylococcus* (KPS) fajok, gyakorta kolonizálják emberek és állatok bőrét és nyálkahártyáit. A két legjelentősebb KPS faj a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) és a *Staphylococcus pseudintermedius* (*S. pseudintermedius*).

A felnőtt lakosság gyakran tünetmentesen hordozza az *S. aureus*-t az orr nyálkahártyáján. Maguk a *S. aureus* által okozott betegségek igen sokrétűek lehetnek, köszönhetően a baktérium számos virulencia faktorának. Léteznek az exotoxin termelésével összefüggő kórképek, de a közvetlen bakteriális invázió következtében kialakult lokális szervfertőzések sem elhanyagolhatóak. Enyhe bőr- és lágyrészfertőzésektől kezdve, akár súlyos, életet veszélyeztető kórképeket is okozhat emberekben, mint például bakteriémiát, tüdőgyulladást, osteomyelitist és agyhártyagyulladást is. Az állatok elsősorban tünetmentes hordozói a *S. aureus*-nak, bennük csak ritkán okoz fertőzéseket, ezek túlnyomórészt bőr- és lágyrész infekciók. Vadon élő állatokban is leírták már *S. aureus*-hoz köthető tályogokat, bakteriémiát, dermatitist, de harapott sebekből is kimutatták már.

A *S. pseudintermedius*-t 2005-ben írták le társállatokból (kutyák és macskák), mint új fajt és napjainkban is ez a legismertebb KPS ezekben az állatokban. Opportunista fertőzéseket okozhat: kutyák pyodermiájának vezető oka, de kimutatták már fülgyulladásból, seb- és húgyúti fertőzésekből is. Az emberek többnyire szoros állati kontaktus során kolonizálódnak ezzel a baktériummal, és szórványosan emberi megbetegedéseket is okozhat: a bőr- és lágyrészfertőzések a leggyakoribbak (akár kutyaharapáshoz köthetően), ugyanakkor invazív fertőzéseket (ízületi protézis és véráram) is dokumentáltak már.

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO), az Élelmiszezésügyi és Mezőgazdasági Szervezet (FAO) és az Állategészségügyi Világszervezet (OIE) felismerve, hogy az emberi és állati egészség, valamint az ökoszisztéma között nagyon szoros a kapcsolat életre hívta az Egy Egészség (One Health) elvét, mely az állati, emberi és környezeti egészségügyi veszélyeket együttesen kezeli. Az Egy Egészség megközelítés a zoonotikus megbetegedésekkel és az antimikrobiális rezisztenciával is foglalkozik. A felgyorsult globalizáció és az éghajlatváltozás következtében a *Staphylococcus* fajok egyre gyorsabb ütemben terjednek. A fertőzött vagy tünetmentes baktérium hordozó állatok rezervoárjai lehetnek a kórokozónak, a velük közeli kontaktusba kerülő emberek

tőlük fertőződhetnek. A *Staphylococcus* fajok ilyen jellegű gazdafaj cseréjét, a legtöbb esetben a baktérium új gazdapopulációhoz való alkalmazkodása követi, mobil genetikai elemek megszerzésével vagy elvesztésével. Így ezek a gazdafaj váltások, új antibiotikum rezisztencia-determinánsok megjelenéséhez és terjedéséhez is vezethetnek.

A *Staphylococcus* fajoknál az új gazdafajok meghódításán túl az antibiotikum-rezisztencia kialakulása is egyre nagyobb probléma. A rezisztencia terjedése miatt a vizsgált baktériumfajok által okozott fertőzések kezelése egyre nehezebb és költségesebb. Itt a legnagyobb jelentőségű a meticillin rezisztens *S. aureus* (MRSA) és *S. pseudintermedius* (MRSP) törzsek megjelenése, mivel ezek minden  $\beta$ -laktám antibiotikummal szemben rezisztensek, az ötödik generációs cefalosporinokat kivéve. Az első MRSA törzseket az 1960-as években elején dokumentálták, csupán pár évvel a meticillint klinikai gyakorlatba történő bevezetése után. Először csak kórházi eredetű törzsek cirkuláltak (HA-MRSA), később ezek a baktériumok terjedtek a közösségekben is (CA-MRSA) és alkalmazkodtak állatokhoz is (LA-MRSA). A 2000-es évek elején megjelentek az első vancomycin-rezisztens törzsek (VRSA), amelyek tovább csökkentették a *S. aureus* elleni, hatékony antibiotikumok listáját. Mivel a *S. pseudintermedius* viszonylag új faj, nem rendelkezik ilyen hosszú múlttal, ezért az első MRSP törzseket csak 2007-ben dokumentálták.

## Célkitűzések

A kutatás elsődleges célja a KPS prevalencia felmérése volt többféle célpopulációban: kutyákban és gazdáikban vizsgáltuk a KPS előfordulást kutyafuttatókban, állatorvosokban, gazdikban és házi kedvenceikben állatorvosi rendelőkben, valamint a hazai sündisznó populációban, mint a *mecC*-MRSA törzsek lehetséges rezervoárjai.

Az izolált humán és állati törzsek összehasonlításra kerültek rezisztencia és virulencia génjeik alapján. A törzsek genetikai rokonságát molekuláris módszerek segítségével tovább vizsgáltuk, hogy részletesebb információkat kaphassunk a KPS izolátumok emberek és állatok közötti átvitelének dinamikájáról.

## Módszerek

### **Minta gyűjtés**

2015-ben Budapesten (61%) és további 14 magyar városban (39%) összesen 102 kutyát és 84 gazdát szűrtünk kutya futtatókban. 2016 októbere és 2017 márciusa között kilenc különböző állatkórházban 101 embert (72 tulajdonos és 29 állatorvos) és 81 állatot (65 kutya, 13 macska és egy-egy törpehőrcsög, nyúl és papagáj) vizsgáltunk. 2020 februárja és júniusa között 200 vadon élő sündisznót (125 élő és 75 elhullott) szűrtünk *S. aureus* hordozásra. A sünök egy része a Fővárosi Állat- és Növénykert mentett állatai közül került ki. Az elhullott sündisznók elgázolt állatok voltak Budapestről és környékéről. Magára a mintavételezésre a budapesti Állatorvostudományi Egyetem Parazitológiai és Állattani Tanszékén került sor.

A kutya-futtatón végzett kutatásába csak egészséges tulajdonosokat és állataikat vontuk be. Az állatkórházi vizsgálatokban az állatok egy része nem KPS-sel összefüggő megbetegedés miatt kereste fel a rendelőket, a maradék pedig panaszmentesen érkezett oltásra/éves szűrővizsgálatokra. Emberektől orr- és bőrmintákat vettünk, míg az állatokból orr, száj és bőr minta került levételre steril vattapálcás mintavevő segítségével. Minden mintát transzport tápközegben (Sigma Transwab Stuart's Charcoal, Medical Wire & Equipment, Corsham, UK) szállítottunk a laboratóriumba. A sündisznóknál mindkét orrlyukból egy, a hagyományosnál kisebb vattapálcával vettünk mintát, melyet egy folyékony Amies transzport közegbe helyeztünk (Sigma Transwab ENT, Medical Wire & Equipment, Corsham, UK), a tüskék és az ujjak közötti bőrről pedig hagyományos mintavevővel történt a mintázás (Sigma Transwab Stuart's Charcoal, Medical Wire & Equipment, Corsham, UK).

A kutatást és annak módszereit a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásaitkai Bizottsága (RKEB) hagyta jóvá (engedély számok: SE RKEB 180/2020, SE RKEB 181/2020).

### **Tenyésztés és fajszintű azonosítás**

A vizsgálatokhoz tartozó mintákat 48 órán belül a Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetébe szállítottuk további elemzés céljából.

A minták inkubálása egy éjszakán keresztül 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett, véres agar lemezekén történt. A KPS fajokat telepmorfológiájuk alapján kerestük (β-hemolitikus udvar, arany vagy fehér pigment termelő telepek). A gyanús telepeket tovább vizsgáltuk

kataláz és Pastorex latex agglutinációs teszt segítségével (Pastorex Staph-Plus Kit, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Franciaország), majd tovább szélesztettük őket, hogy elvégezhessük a fajsztűtű azonosításra alkalmas PCR-eket.

*S. aureus* kimutatására a fajspecifikus termonukleáz *nucA* gént azonosító PCR-t végeztük el. A *S. pseudintermedius* esetében kezdetben a foszfát-acetiltranszferáz *pta* gén PCR-RFLP-jét végeztük el, majd később áttértünk a fajspecifikus *nucA* gén PCR-es kimutatására.

### **Antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok**

A kutya futtatás mintáknál a penicillin, oxacillin, eritromicin, klindamicin, tetraciklin, gentamicin, ciprofloxacín, mupirocin antibiotikumok esetében, a rezisztencia vizsgálat agar hígításos módszerrel történt, míg a cefoxitin esetében korong diffúziós módszert alkalmaztunk. A klindamicinnel szembeni indukálható rezisztencia vizsgálatára D-tesztet végeztük, ahol szükséges volt. Ezen hatóanyagok mellett az állatkórházi mintákban az alábbi antibiotikumokat vizsgáltuk még hígításos módszerekkel: levofloxacin, szulfametoxazol-trimetoprim, vancomycin.

A sündiszók mintáihoz MIC tesztcsíkokat (Liofilchem®, Roseto degli Abruzzi, Teramo, Olaszország) használtunk. Ezeknek a mintáknak az esetében a penicillin, eritromicin, klindamicin, gentamicin, ciprofloxacín, tetraciklin és mupirocin antibiotikumokkal szembeni érzékenységüket vizsgáltuk. A cefoxitin és vancomycin esetében itt is korong diffúziót, illetve mikrodilúciós módszert használtunk.

A KPS törzseket kation-beállított Müller-Hinton lemezekre oltottuk, és az EUCAST előírt értékei alapján interpretáltuk a kapott eredményeinket. Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokhoz kontroll törzsként az *S. aureus* ATCC 29213-t használtuk. A meticillin rezisztencia igazolására PCR vizsgálatokat végeztünk az összes KPS izolátumon a *mecA* és az újabb *mecC* gén kimutatására. Az állatorvosi felmérés KPS izolátumaiban a *tetK*, *tetM*, *ermA*, *ermB*, *vanA*, *mupA*, rezisztencia gének jelenlétének kimutatására is PCR vizsgálatokat végeztünk.

### **Virulencia gének kimutatása PCR módszerekkel**

Az *S. aureus* törzsek adhézióért és a biofilm képződésért felelős génei közé tartoznak a következők: *icaD*, *cna*, *fnbA*, *fnbB*, míg a toxintermelésében jelentősek a *pvl*, *tsst*, *sea*, *seb*, *sec*, *eta*, *etb*, *hla*, *hlb*, *hlg*, *hlg-v* gének. Ezeket PCR-rel vizsgáltuk. A *S.*

*pseudintermedius*ban az *icaD*, *siet*, *lukF-I*, *lukS-I*, *hld*, *psme* virulencia géneket vizsgáltuk ugyanezzel a módszerrel.

### **Genotipizálás**

A KPS törzsek genetikai rokonságát *Sma*I restriktációs endonukleáz emésztés után pulzáló mezejű gélelektroforézises (PFGE) vizsgálattal állapítottuk meg. A géleképek analízisét a Fingerprinting II szoftverrel (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Franciaország) végeztük.

Az általunk érdekesebbnek ítélt *S. aureus* törzseket a Biomi Kft. laboratóriumába (Gödöllő, Magyarország) küldtük spa-tipizálásra. Minden új spa-típust elküldtünk a Ridom Spa szerverhez (<https://spa.ridom.de/submission.shtml>).

Bizonyos kiválasztott *S. aureus* és *S. pseudintermedius* törzsek multilókusz szekvencia tipizálásra (MLST) is kerültek a PubMLST protokoll szerint, majd az egyes szekvenciatípusokat az MLST adatbázison keresztül határoztuk meg. Az összes *mecA*-MRSA izolátum *SCCmec* tipizálását PCR-rel végeztük.

### **Teljes genom szekvenálás és adatelemzés**

A kutya futtatós mintákból két gazda-kutya közös hordozásból (a tulajdonosból és állatból azonos KPS fajt izoláltunk) származó *S. aureus* (Q37, Q38), valamint két közösen hordozott *S. pseudintermedius* (Q81, Q82) izolátum került teljes genom szekvenálásra. Továbbá két másik, eltérő földrajzi helyről származó *S. aureus* (Q47, Q85) megegyező PFGE gélképet mutattak, így ezeket is teljes genom szekvenálásra (WGS) küldtük Állatorvostudományi Kutatóintézetbe (Budapest, Magyarország), hogy részletesebb képet kaphassunk genomjaik hasonlóságáról, estleges teljes egyezéséről.

A sündisznó vizsgálatból izolált *mecC*-MRSA (H68B1) - mivel ez az első általunk ismert *mecC* izolátum - szintén teljes genom szekvenálásra került a Biomi Kft.-nél, (Gödöllő, Magyarország). Mindegyik szekvenálás Illumina Miseq (Illumina, Inc. San Diego, CA, USA) platformon került elvégzésre.

A nyers genom darabok *de-novo* összeállítását a SPAdes szoftverrel, illetve a Velvet Assembler szoftverrel végeztük, a *de-novo* genomok annotációját a RAST program végezte. A MAUVE programot használtuk az annotált genomok rendezésére.

A kész, feldolgozott genom szekvenciákat feltöltöttük a NCBI GenBankba, az alábbi hozzáférési számokkal: Q37: JAEDAR000000000, Q38: JAEDAS000000000, Q47:

JAEDAT000000000, Q85: JAEDAU000000000, Q81: JAEDAV000000000, Q82: JAEEO000000000, H68B1: JAEQMS000000000.

A genomokban a rezisztencia gének kimutatására a ResFinder 2.3-at (az alapértelmezett beállításokkal) és a CARD-ot használtuk. A WGS-eredményeken alapuló MLST tipizáláshoz az MLST 2.0-t használtuk. Az izolátumok allélprofilját összehasonlítottuk a PubMLST adatbázisban található allélszekvenciákkal is ellenőrzés céljából. A szekvenált MRSA izolátumok *SCCmec* típusát az SCCmecFinder 1.2 segítségével határoztuk meg. A virulencia- és toxingéneket a VirulenceFinder 2.0 (az alapértelmezett beállításokkal) és a VFalyzer segítségével kerestük. A genomokban található virulencia szigetek keresése során a szekvenciákat és annotációkat a Geneious 11.1 segítségével hasonlítottuk össze.



## Eredmények

### Hordozási arányok

A kutya futatókról származó minták esetében az *S. aureus* hordozási arány embereknél 23,8% (20/84), kutyáknál 4,9% (5/102) volt, a minták között MRSA-t nem találtunk. A *S. aureus* hordozási aránya állatokban 14,8% (12/81), embereknél 34,6% (35/101) volt az állatkórházi vizsgálat esetében. Az emberi hordozók itt két alcsoportra oszthatók: az első a kisállat tulajdonosok köre, ahol a hordozás 33,3% (24/72) a második az állatorvosi személyzet köre, ahol a hordozás 37,9% (11/29) volt. MRSA-t csak kutyamintából mutatták ki, így az MRSA prevalencia 1,2% volt (1/81).

Mindössze két olyan *S. aureus* közös hordozást találtunk a kutya-futtatók esetében, ahol a kutyák és gazdáik is ugyanazt a mikroorganizmust hordozták. Azonban hat ilyen *S. aureus* közös hordozást találtunk házi kedvencek és gazdáik között az állatkórházi vizsgálatok során.

A *S. pseudintermedius* hordozás fordított arányokat mutatott a *S. aureus*hoz képest. Ebben az esetben 2,4%-os (2/84) prevalenciát mutattunk ki emberekből és 34,3%-ot (35/102) kutyákból, a kutya-futtatók mintáiban esetében nem volt MRSP. Itt csak egy közös hordozás esetet észleltünk. Az állatkórházi felmérés esetében a *S. pseudintermedius* hordozási aránya háziállatokban 58,0% (47/81), emberekből 19,8% (20/101) volt. Az emberi hordozók itt is ugyanabba a két alcsoportba sorolhatók, mint a *S. aureus* esetében. A hordozási arány a tulajdonos csoportban 15,3% (11/72), az állatorvosi csoportban 31,0% (9/29) volt. Összesen hat MRSP-t izoláltunk, hármat emberből és hármat kedvtelésből tartott állatoktól, így a prevalencia állatokban 3,7% (3/81), emberekből 2,9% (3/101). Tíz esetben találtunk közös hordozást.

A sündisznók vizsgálata során 13 sündisznóból (13/200) izoláltunk *S. aureus* törzseket, ami 6,5%-os hordozási arányt jelentett. Két izolátum bizonyult MRSA-nak (2/200), amivel a MRSA prevalenciája 1,0%-os.

### Antibiotikum-érzékenység

Kijelenthető, hogy a KPS izolátumok többségében érzékenyek voltak a vizsgált antibiotikumokra. A kutya-futtatók vizsgálatból származó *S. aureus*-ok esetében a legjelentősebbnek a 60,0%-os (15/25) penicillin rezisztencia mutatkozott. Egy izolátum volt multirezisztens (vagyis rezisztens legalább három különböző csoportba tartozó

antibiotikumra). Meglepő módon a *S. pseudintermedius* izolátumok csupán 32,4%-a (12/37) volt rezisztens penicillinre, viszont 56,7%-uk (21/37) mutatott rezisztenciát tetraciklinre. Hét izolátum volt multirezisztens.

Az állatorvosi vizsgálatból a *S. aureus* izolátumok emelkedett rezisztenciát mutattak penicillinnel (57,4% - 27/47) és a makrolid-linkozamid csoporttal (MLSB) (klindamicin 31,9% (15/47) és eritromicin 23,4% (11/47)) szemben valamin tetraciklinek ellen 8,5% (4/47). A D-teszt 11 törzsnél volt pozitív, ezek indukálható klindamicin rezisztenciával rendelkeztek. Öt izolátum volt multirezisztens. Csupán egy kutya orrából származó izolátum (CS20/1) bizonyult MRSA-nak. Ezt a *mecA* gén és a *SCCmec* IV génekazetta kimutatásával is megerősítettük. Egy másik törzs (ÁO30) rezisztenciát mutatott ugyan oxacillinnel szemben, de érzékeny volt a cefoxitinre, és mindegyik *mec* gén hiányzott belőle. Ezt borderline, azaz határeset oxacillin-rezisztens *S. aureus*-nak (BORSA) nevezzük. A rezisztencia gének felkutatására PCR vizsgálatokat is végeztünk. Ezek a tesztek az *ermA* (n=4) és az *ermB* (n=1) géneket azonosították az MLSB rezisztencia lehetséges okaiként.

Az állatkórházi vizsgálatban a *S. pseudintermedius* izolátumok antibiotikum érzékenységüket tekintve a *S. aureus* törzsekhez hasonló tendenciát mutattak. A penicillin rezisztencia volt itt is a legmagasabb arányú, a minták 41,7%-a (28/67) volt rezisztens. Hat minta bizonyult meticillin rezisztensnek (MRSP) mind cefoxitin korong diffúziós, mind *mecA* PCR módszerekkel. 14 törzs volt multirezisztens. A PCR tesztek az *ermB* gént azonosították, mint lehetséges felelős az MLSB rezisztencia mögött, a *tetK* (n=1) és a *tetM* (n=15) géneket pedig a tetraciklin rezisztencia mögött.

A sünökből izolált *S. aureus* törzsek érzékenyek voltak a vizsgált antibiotikumok többségére, és nem találtunk multirezisztens izolátumokat. Az egyetlen kivétel a penicillin volt, amelyekre a *S. aureus* minták 6/13-a (46,1%) mutatott rezisztenciát. Fenotípusosan két izolátum bizonyult cefoxitin rezisztensnek. A további PCR analízis igazolta, hogy ez a két törzs MRSA volt: az egyik a *mecA* gént, míg a másik az új *mec* homológ *mecC* gént hordozta.

### **Virulencia tényezők**

A kutya futtatóról származó *S. aureus* izolátumok csupán kisebb része hordozott enterotoxin géneket: *sea* (3/25), *seb* (1/25), *sec* (3/25). A *tstt* gén csak egyetlen *S. aureus*-ban volt jelen. Ezeket a toxingéneket csak emberi eredetű *S. aureus*-okban

mutattunk ki. Azonban minden izolált *S. pseudintermedius* törzs (állati és emberi izolátum egyaránt) hordozta a *siet* gént (37/37).

Az állatorvosi kórházi vizsgálatból származó izolátumok esetében mind az emberi, mind az állati eredetű *S. aureus* törzsekben számos biofilm képzésért és toxin termelésért felelős gént sikerült kimutatni. Nagyon sok izolátum legalább egyfajta hemolizin gént is hordozott: *hla* (23/47), *hlg* vagy *hlg-v* (17/47), *hly* (5/47). A *tsst* gén a minták meglepően magas arányában (6/47) jelen volt, főleg humán törzsekben (5/6), a C típusú staphylococcus enterotoxin közel hasonló gyakorisággal (5/47) volt megtalálható. A humán és állati eredetű *S. pseudintermedius* izolátumokban *siet* (48/67), *lukF-I* (58/67), *lukS-I* (58/67), *hld* (64/67), *psm* (64/67) fordult elő, továbbá a 67 törzs közül 64-ben azonosítottuk az *icaD*-t, mely az *ica*-operon része. Az egyetlen MRSA izolátum csupán egy toxin gént hordozott: az A típusú enterotoxint, míg az MRSP izolátumokban több toxin gén is kimutatható volt: *siet* (4/6), *lukF*, *lukS* (5/6), *hld* (6/6), *psm* (6/6).

A sünekből izolált *S. aureus* törzsekben nem találtunk toxin géneket PCR vizsgálatokkal, ellenben a legtöbbjük adhézióért és biofilm termelésért felelős génekkel rendelkezett (*icaD* 13/13, *fnbA* 13/13, *fnbB* 11/13, *cna* 1/13). Az egyetlen különbség a virulencia géneket tekintve, a *mec* géneken kívül, a két sün eredetű MRSA között az volt, hogy az *fnbB* gén hiányzott a *mecC*-MRSA-ból.

### **Klonalitás és genotipizálás**

A PFGE vizsgálatokat minden koaguláz pozitív izolátumon elvégeztük annak megállapítására, hogy a közösen hordozott izolátumok azonos gélképet mutatnak-e, valamint, hogy felmérjük a vizsgált populációkban talált törzsek genomiális kapcsolatait.

A PFGE analízissel hasonló gélképeket találtunk a különböző földrajzi területekről származó mintákon és a nem összetartozó ember-kutya izolátumok között is, mind a kutya futtatós, mind az állatkórházi vizsgálataink során.

A két eset közül, amikor a gazda és kutyája közösen hordozott *S. aureus* izolátumokat a kutya futtatós felmérésben, az egyiknél (Q37-Q38) ugyanazt a PFGE mintázatot találtuk. A másik együtt hordozott pár (Q84-Q85) azonban különbözött egymástól. Itt, azonban a tulajdonos mintája (Q84) megegyezett az előző Q37-Q38 pár mintájával, míg a kutya mintája (Q85) egy másik városból származó emberi *S. aureus* izolátumhoz

(Q47) hasonlított. Ezeket az izolátumokat tovább vizsgáltuk, és az MLST és spa analízis kimutatta, hogy a Q37-Q38 izolátumok az ST15-t084-hez, míg a Q47-Q85 az ST45-höz tartoznak. Az ST45 izolátumok két különböző spa típusba sorolódtak, a t630 és t671 típusba.

A kutya-futtatókból származó *S. pseudintermedius* izolátumok esetében az egyetlen kutya-tulajdonos együttes hordozás mintái (Q81-Q82) ugyanazt a restrikciós mintát mutatták, és MLST analízissel mindkettőben ugyanazt az új allélkombinációt találtuk (10-24-4-2-19 -26-2), amelyet az MLST kurátorai ST1685-nek neveztek el.

Az állatkórházi felmérés során is megvizsgáltuk az együtt hordozott törzsek klonalitását. Az *S. aureus* PFGE mintázata a hat közös hordozási esetből két esetben mutatott azonos izolátumokat (B13-B15, B9-B11), az *S. pseudintermedius* esetében hét esetben észleltünk hasonló gélmintázatot (P11- P12, B28-B29, K5-K7, A34-A37, K37-K39, E26-E28, SL12-SL13) a tíz közös hordozásos eset közül.

Az állatkórházi törzsek közül MLST-vel vizsgáltunk néhány kiválasztott, reprezentatív mintát. A talált *mecA*-MRSA SCC*mec* IV típusú volt, és mind ez az izolátum, mind a BORSA törzs az ST45-höz tartozott. A tipizált törzsek közül további egy humán törzs ST5 volt, és két kutya izolátum az ST630 és az ST12-be tartozott. A megvizsgált MRSP izolátum az ST551-be tartozott, míg az elemzett MSSP törzs egy új allélkombinációval (1-63-4-2-8-1-1) rendelkezett, amelyet ST2064 nevet kapta.

A 13 *S. aureus* sündisznó izolátum PFGE dendrogramja két fő ág jelenlétét mutatta 93%-os hasonlósági szinten, és csak a *mecA*-MRSA mutatott jelentősen eltérő mintázatot. Az *S. aureus* izolátumok spa tipizálásának eredménye szerint a törzsek hét különböző típusba tartoztak: t091 (n=3), t843 (n=3), t18328 (n=2), t008 (n.=2), t449 (n=1), t330 (n=1) és t19701 (n=1).

A *mecC*-MRSA izolátum MLST típusa az ST130 egyik változata volt. Egy nukleotidban tért el az *arcC* génben, ezért egy új allélszámot (*arcC*-793) és egy új szekvenciatípust (ST6736) kapott a pubMLST kurátoraitól. A *mecC*-MRSA törzs spa tipizálása során szintén egy új kombinációt (04-82-17-25-17-25-25-110) és új spa típust (t19701) mutatott. A *mecA*-MRSA izolátum a CC45-ST3060.t330 spa típushoz tartozott és SCC*mec* IV génkazettát tartalmazott.

### Teljes genom szekvenálások (WGS)

Mind a négy WGS-elemzett *S. aureus* izolátum hordozta a szerzett *blaZ*  $\beta$ -laktamáz gént. Ezenkívül a Q37-Q38 pár tartalmazta a *tetK* és a *fosB* gént (1. táblázat).

Mind a négy *S. aureus* izolátum tartalmazta a biofilm termelés legfontosabb génjét, az *ica* operont. Ezen túlmenően számos, az MSCRAMM-ek termeléséért felelős gént, a 8-as szerotípusú tok termeléséért felelős géneket (*cap8H*, *cap8I*, *cap8J*, *cap8K*) és a staphylococcus immunglobulin-kötő fehérje génjét (*sbi*) is megtaláltuk.

A *S. pseudintermedius* izolátumok az *ica* operont, és a quorum-sensing géneket (*agrA*-*agrD*) tartalmazták. Továbbá egy az *S. aureus* immunglobulinkötő fehérjéjére hasonlító gént (*sbi*) is találtunk. A biofilm képző virulencia faktorok mellett számos enzim és toxin gént is detektáltunk. A citotoxint kódoló gének közül a *hly*, *hly-III* hemolizint és a *lukS* leukocidint hordozták a törzsek. Mindkettő enterotoxin (*sec-int*) és exfoliatív toxin (*siet*, *expB*) pozitív is volt.

Csak a Q37-Q38 *S. aureus* párnak volt *lukE* és a *lukD* leukocidinje. Érdekes módon mind a Q47, mind a Q85 *S. aureus* számos staphylococcus enterotoxin (SE) gént tartalmazott: *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, *seu* mindkettőben jelen volt, továbbá a Q47 a *sec* és *sel* géneket is hordozta.

A *mecC*-MRSA izolátum elemzése során *blaZ*, *mecC* és *lmrS* rezisztencia gének jelenlétét mutattuk ki (1. táblázat). A toxingének tekintetében a bakteriális genomban azonosították a *hlg*-lókuszt, amely a gamma hemolizin géneket (*hlgA*, *hlgB*, *hlgC*) tartalmazza, és a *lukD-lukE*, *lukH-lukG* két komponensű leukocidineket találtuk. Egy viszonylag új exfoliatív toxin génhomológot, az *etE*-t (korábban *etD2*-nek hívták) is sikerült kimutatnunk. Elemzésünk során a tipikus *S. aureus* enzimeket kódoló géneket találtuk. Ezenkívül a *mecC*-MRSA izolátum tartalmazta az *ica* operont és MSCRAMM-ek termeléséért felelős géneket is. A tok termelésért felelős gének közül a 8-as szerotípusú génjeit hordozta az izolátum. Az immunrendszer elkerüléséért felelős faktorok közül a *spa* és a *sbi* is kimutatható volt. Az *SCCmec* gén kazetta analízise alapján a *mecC* gént hordozó izolátum a XI. típusozhoz tartozott.

**1. táblázat. Tipizálások és rezisztencia gének a teljes genom szekvenált izolátumokban.**

Izolátum	Faj	Eredet	Minta	ST – spa típus	Fenotípusos rezisztencia	Genotípusos rezisztencia	Virulencia gének
<b>Q37</b>	AUR	ember orr	Magyargencs	ST15-t084	PEN, TET	<i>blaZ, tet(K), fosB</i>	-
<b>Q38</b>	AUR	kutya orr	Magyargencs	ST15-t084	PEN, TET	<i>blaZ, tet(K)</i>	-
<b>Q47</b>	AUR	ember orr	Szigetvár	ST45-t630	PEN	<i>blaZ</i>	<i>egc</i> cluster: <i>seg, sei, sem, sen, seo, seu</i> enterotoxin gének
<b>Q85</b>	AUR	kutya orr	Tatabánya	ST45-t671	PEN	<i>blaZ</i>	<i>egc</i> cluster: <i>seg, sei, sem, sen, seo, seu</i> enterotoxin gének
<b>Q81</b>	PSE	ember orr	Budapest	ST1685	-	-	-
<b>Q82</b>	PSE	kutya száj	Budapest	ST1685	-	-	-
<b>H68B</b>	AUR	sүн bőr	Budapest	CC130 - ST6736- t19701	PEN	<i>blaZ, mecC</i>	<i>etE</i>

AUR=*S. aureus*, PSE=*S. pseudintermedius*

## Következtetések

- Ez az első tanulmány Magyarországon, mely a két jelentős koaguláz-pozitív *Staphylococcus* faj: a *S. aureus* és a *S. pseudintermedius* prevalenciáját vizsgálta kedvtelésből tartott állatok és gazdáik, valamint az állatorvosok körében.
- A rezisztencia és virulencia gén mintázatok és a talált genombeli hasonlóságok alapján bizonyítékot szolgáltatunk a *Staphylococcus* fajok emberek és állatok közötti lehetséges átvitelére.
- Meticillin rezisztencia nagyon kevés esetben fordult elő a vizsgált *Staphylococcus* fajok között. Csak egy MRSA-t mutattunk ki a vizsgálat során (kutyában), egy BORSA-t izoláltunk egy állatorvosból és összesen hat MRSP-t emberekből és kutyákból vegyesen.
- A felméréseink során izolált, hordozott törzsek nagyobb arányban voltak érzékenyek a terápiában használt antibiotikumokra, mint a térségben található humán klinikai izolátumok.
- Humán és állati eredetű *Staphylococcus* izolátumainkban egyaránt találtunk virulencia faktorokat (toxin gének, enzimek, adhéziós faktorok), a sün eredetű mintákban pedig egy új exfoliatív toxin gént (*etE*) is sikerült kimutatni.
- A PFGE, MLST és spa-tipizálás segítségével számos jól ismert nemzetközi klónt (hordozott és klinikai) mutattunk ki.
- A *S. aureus* klónok egy részét (pl. ST45) már több évvel ezelőtt leírtuk humán hordozási vizsgálataink során, jelezve ezeknek a klónoknak a hosszú távú magyarországi cirkulációját.
- Magyarországon ez az első felmérés vadon élő állatok *Staphylococcus*-hordozásáról.
- Ez a *mecC*-MRSA első leírása Magyarországon.
- A *mecC*-MRSA prevalenciája jóval alacsonyabb az általunk vizsgált magyar sün állományban, mint az észak-európai megfigyeléseknél. Ettől függetlenül a talált *mecC*-MRSA-nak nagy jelentősége van, valószínűleg előbb utóbb háziállatokhoz is adaptálódik és akár egy új, potenciális humán kórokozóvá is válhat.

## Saját publikációk jegyzéke

### Az értekezés témájában megjelent közlemények

Judit Sahin-Tóth, Ervin Albert, Alexandra Juhász, Ágoston Ghidán, János Juhász, Andrea Horváth, Martin C Steward, Orsolya Dobay (2022):

Prevalence of *Staphylococcus aureus* in wild hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) and first report of *mecC*-MRSA in Hungary.

Science of The Total Environment, 815:152858. **IF(2020)=7.963**

Judit Sahin-Tóth, Eszter Kovács, Adrienn Tóthpál, János Juhász, Barbara Forró, Krisztián Bányai, Orsolya Dobay (2021).

Whole genome sequencing of coagulase positive staphylococci from a dog-and-owner screening survey.

PLOS One, 16(1):0245351. **IF(2020)=3.240**

### Nem az értekezés témájában megjelent közlemények

Andrea Horváth, Orsolya Dobay, Judit Sahin-Tóth, Emese Juhász, Júlia Pongrácz, Miklós Iván, Kristóf Kristóf (2020).

Characterisation of antibiotic resistance, virulence, clonality and mortality in MRSA and MSSA bloodstream infections at a tertiary-level hospital in Hungary: a 6-year retrospective study.

Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 19(1):17. **IF=3.944**

Eszter Kovács, Judit Sahin-Tóth, Adrienn Tóthpál, Mark van der Linden, Tamás Tirczka, Orsolya Dobay (2020).

Co-carriage of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* among three different age categories of children in Hungary.

PLOS One, 15(2):0229021. **IF=3.240**

Eszter Kovács, Judit Sahin-Tóth, Adrienn Tóthpál, Katalin Kristóf, Mark van der Linden, Tamás Tirczka, Orsolya Dobay (2019).



Vaccine-driven serotype-rearrangement is seen with latency in clinical isolates: Comparison of carried and clinical pneumococcal isolates from the same time period in Hungary.

Vaccine, 37(1):99–108. **IF=3.143**

Krisztina Laub, Adrienn Tóthpál, Eszter Kovács, Judit Sahin-Tóth, Andrea Horváth, Szilvia Kardos, Orsolya Dobay (2018).

High prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal carriage among children in Szolnok, Hungary.

Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 65(1):59–72. **IF=1.079**

Krisztina Laub, Katalin Kristóf, Tamás Tirczka, Adrienn Tóthpál, Szilvia Kardos, Eszter Kovács, Judit Sahin-Tóth, Andrea Horváth, Orsolya Dobay (2017).

First description of a catalase-negative *Staphylococcus aureus* from a healthy carrier, with a novel nonsense mutation in the *katA* gene.

International Journal of Medical Microbiology, 307(8):431–434. 2017 **IF=3.298**