

**Szent István Egyetem  
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

**Az amoxicillin-klavulánsav kombináció összehasonlító  
farmakokinetikája brojlercsirkében és pulykában, valamint  
baktérium-érzékenységi és stabilitási vizsgálata**

**PhD-értekezés**

Készítette:

**Dr. Jerzsele Ákos**

**2009**

Szent István Egyetem  
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....  
Prof. Dr. Gálfi Péter  
témavezető

Dr. Csikó György  
SZIE-ÁOTK Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

Dr. Lehel József  
SZIE-ÁOTK Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

.....  
Dr. Jerzsele Ákos

## TARTALOMJEGYZÉK

Gyakrabban alkalmazott rövidítések .....	5
1. Összefoglalás.....	6
2. Bevezetés és célkitűzés .....	9
2.1. Az amoxicillin-klavulánsav kombináció .....	9
2.2. Az amoxicillin-klavulánsav kombináció használata a humán- és állatgyógyászatban .....	10
2.3. Célkitűzés .....	12
3. Az amoxicillin-klavulánsav kombináció farmakokinetikája házityúban és pulykában intravénás és szájon át való alkalmazást követően.....	14
3.1. Irodalmi áttekintés.....	14
3.2. Anyag és módszer .....	20
3.2.1. A brojlercsirkéken végzett farmakokinetikai vizsgálat.....	20
3.2.2. A pulykákön végzett farmakokinetikai vizsgálat.....	25
3.3. Eredmények .....	29
3.3.1. A brojlercsirkéken végzett farmakokinetikai vizsgálat.....	29
3.3.2. A pulykákön végzett farmakokinetikai vizsgálat.....	34
3.4. Megbeszélés.....	39
3.4.1. A brojlercsirkéken végzett farmakokinetikai vizsgálat.....	39
3.4.2. Pulykákön végzett farmakokinetikai vizsgálat.....	40
3.4.3. Az amoxicillin-klavulánsav kombináció összehasonlító farmakokinetikája csirkében és pulykában per os és intravénás beadást követően .....	41
4. Baromfiból izolált <i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> és <i>P. multocida</i> baktériumtörzsek érzékenysége az amoxicillin-klavulánsav kombinációra.....	43
4.1. Irodalmi áttekintés.....	43
4.2. Anyag és módszer .....	50
4.3. Eredmények .....	53
4.3.1. Az <i>E. coli</i> törzsek érzékenysége amoxicillinre.....	53
4.3.2. Az <i>E. coli</i> törzsek érzékenysége a 2:1 arányú amoxicillin-klavulánsav kombinációra.....	53

4.3.3.	<i>A S. enterica</i> törzsek érzékenysége amoxicillinre.....	54
4.3.4.	<i>A S. enterica</i> törzsek érzékenysége a 2:1 arányú amoxicillin-klavulánsav kombinációra.....	54
4.3.5.	<i>A P. multocida</i> törzsek érzékenysége amoxicillinre .....	54
4.3.6.	<i>A P. multocida</i> törzsek érzékenysége a 2:1 arányú amoxicillin-klavulánsav kombinációra.....	55
4.4.	Megbeszélés.....	56
5.	Az amoxicillin-klavulánsav kombináció stabilitás-vizsgálata .....	59
5.1.	Irodalmi áttekintés.....	59
5.2.	Anyag és módszer .....	64
5.3.	Eredmények .....	68
5.4.	Megbeszélés.....	69
5.4.1.	Vízkeménységi vizsgálatok.....	69
5.4.2.	Vizsgálatok a pH függvényében .....	69
5.4.3.	A hatóanyagok bomlása fém- és műanyag itatóedényben.....	70
6.	Záró megbeszélés .....	72
7.	Új tudományos eredmények .....	75
8.	Irodalomjegyzék.....	77
9.	Saját publikációk .....	82
10.	Függelék.....	83
11.	Köszönetnyilvánítás.....	124

## GYAKRABBAN ALKALMAZOTT RÖVIDÍTÉSEK

- A= a megoszlási egyenes metszéspontja az „Y” tengellyel a koncentráció-idő grafikonon
- $AUC_{0-\infty}$ = area under the plasma concentration-time curve=az extrapolált plazmakoncentráció-idő grafikonon ábrázolt görbe alatti terület
- $AUC_{rest}$ =az utolsó mért pont utáni extrapolált plazmakoncentráció-idő görbe alatti terület
- B= az eliminációs egyenes metszéspontja az „Y” tengellyel a koncentráció-idő grafikonon
- BHI=brain-heart infusion
- CFU=colony forming units=telepformáló egység
- $Cl_B$ = teljes test clearance
- CLSI=Committee of Laboratory Standards Institute
- $C_{max}$ = maximális plazmakoncentráció
- CSV=csontvelő
- D=dózis
- EMA=European Medicines Agency=Európai Gyógyszerügynökség
- ESBL=extended spectrum beta-lactamase=szélesített spektrumú  $\beta$ -laktamáz
- F= absolute bioavailability=abszolút biológiai hasznosulás
- FDA=Food and Drug Administration=az USA gyógyszer-felügyelő hatósága
- HPLC=high performance liquid chromatography=nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
- $K_{ab}$ = felszívódási sebességi állandó
- LOD=limit of detection=kimutathatósági határérték
- LOQ=limit of quantification=meghatározási határérték
- M=monitoring vizsgálat
- mAU=milli-absorbance unit=elnyelési egység
- MH=Müller-Hinton
- MIC=minimum inhibitory concentration=minimális gátló koncentráció
- MRL=maximum residue limit=maximális maradványanyag-szint egy adott állati termékben
- MRT= mean residence time=átlagos szervezetben való tartózkodási idő
- PBP=penicillin-binding protein=penicillinkötő fehérje
- RP-HPLC=reversed phase high performance liquid chromatography= fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
- SD= standard deviation
- $t_{1/2ab}$ = felszívódási felezési idő
- $t_{1/2\alpha}$ = megoszlási felezési idő
- $t_{1/2\beta}$ = eliminációs felezési idő
- $t_{max}$ = a maximális plazmakoncentráció eléréséhez szükséges idő
- $V_c$ = a központi rekesz látszólagos térfogata
- $V_{d(ss)}$ = megoszlási térfogat a „steady state” elérésekor
- $V_d$ = látszólagos megoszlási térfogat
- $\alpha$ = megoszlási sebességi együttható
- $\beta$ = eliminációs sebességi együttható

## 1. ÖSSZEFOGLALÁS

Az amoxicillin-klavulánsav kombináció széles antibakteriális spektruma, baktericid hatásmódja, valamint nagy terápiás indexe miatt világszerte alkalmazott antibiotikum a humán és az állatgyógyászatban egyaránt. Mind társállatokban (kutyában, macskában), mind haszonállatainkban (kérődzőkben, sertésben) alkalmazható számos fontos patogén baktérium által okozott fertőzés gyógykezelésére. Házityúkban és pulykában felhasználása az Európai Unióban és a világ fejlett országaiban (pl. USA) nem engedélyezett, mert a klavulánsav nem rendelkezik elfogadott MRL-értékkel, így az élelmezés-egészségügyi várakozási idő megállapítása ezen állatfajokban nem lehetséges. A  $\beta$ -laktamáz enzimet termelő baktériumtörzsek egyre növekvő száma, és az ezzel összefüggésbe hozható terápia-rezisztencia azonban a jövőben szükségessé teheti a kombináció ezen állatfajban való alkalmazását is, melyhez farmakokinetikai és farmakodinámiai adatok szükségesek. A szakirodalomban azonban nem található adat a kombináció per os biológiai hatásáról, valamint a szájon át való adagolást követően a hatóanyagok farmakokinetikai viselkedéséről. A kombináció hatásmechanizmusából fakadóan pedig kiemelt jelentőségű, hogy a hatóanyagok kinetikai viselkedése hasonló legyen. Nem találunk továbbá naprakész adatokat a legfontosabb baromfi-patogén kórokozó baktériumok MIC-értékeiről, holott ezek ismerete elengedhetetlen a szer hatékonyságának megállapításához. Ismereteink hiányosak továbbá kombináció vízben való feloldását követő bomlékonyságát illetően is, holott baromfiállományokban a medikált ivóvízben való gyógyszeres kezelés az elsődleges.

Vizsgálataink célja a két hatóanyag farmakokinetikájának jobb megismerése volt házityúkban és pulykában intravénás és szájon át való alkalmazást követően. Összehasonlítottuk továbbá a hatóanyagok kinetikai viselkedését az adott állatfajon belül, hiszen a kombináció hatékonyságának megítéléséhez ezen információk ismerete is szükséges. A hatóanyagok vérplazmából való szimultán meghatározásához saját, validált RP-HPLC-UV módszert dolgoztunk ki.

A legfontosabb farmakokinetikai értékek **brojlersirkében** az amoxicillin-klavulánsav 12,5 mg/ttkg dózisének (10 mg/ttkg amoxicillin, 2,5 mg/ttkg klavulánsav) intravénás beadását követően a következőknek adódtak: a megoszlási felezési idő amoxicillin esetében  $0,11 \pm 0,01$  h, klavulánsavnál  $0,10 \pm 0,01$  h volt, az eliminációs felezési idők  $1,28 \pm 0,05$  h és  $1,15 \pm 0,06$  h voltak. A látszólagos megoszlási térfogat amoxicillin esetében  $1,44 \pm 0,06$  l/kg, míg klavulánsavnál  $1,17 \pm 0,08$  l/kg-os értéket adott. A clearance értékek  $0,78 \pm 0,03$  l/h/kg és  $0,71$  l/h/kg, a szervezetben való átlagos tartózkodási idő (MRT)  $0,88 \pm 0,03$  h és  $0,78 \pm 0,07$  h amoxicillin és klavulánsav esetében. Per os applikációt követően ugyanazon 12,5 mg/ttkg-os dózis alkalmazását követően a felszívódási

felezési idők  $0,15 \pm 0,01$  h és  $0,16 \pm 0,01$  h, az eliminációs felezési idők  $1,28 \pm 0,05$  h, illetve  $1,27 \pm 0,07$  h voltak az amoxicillin és klavulánsav esetében, a maximális plazmakoncentrációnál a két hatóanyag aránya megfelelt a kombináció hatékony arányának (amoxicillin  $3,46 \pm 0,11$  µg/ml, klavulánsav  $1,08 \pm 0,05$  µg/ml; ~3,2:1). A szájon át való alkalmazást követő biológiai hasznosulás brojlercsirkében amoxicillinnél  $63,8 \pm 2,6\%$ , míg klavulánsavnál  $65,7 \pm 3,1\%$ .

**Pulykában** az amoxicillin és a klavulánsav megoszlási felezési ideje intravénás beadást követően  $0,11 \pm 0,01$  h, illetve  $0,12 \pm 0,02$  h voltak, az eliminációs felezési idők  $1,28 \pm 0,03$  h, illetve  $1,18 \pm 0,12$  h-nak adódtak. A clearance érték amoxicillin esetében  $0,78 \pm 0,12$  (l/h)/kg, míg klavulánsavnál  $0,61 \pm 0,03$  (l/h)/kg. A MRT-érték  $0,89 \pm 0,05$  h és  $0,92 \pm 0,05$  h volt amoxicillinnél és klavulánsavnál. A megoszlási térfogat amoxicillin esetében  $1,45 \pm 0,03$  l/kg, míg klavulánsav esetében  $1,04 \pm 0,08$  l/kg-os értéket mutatott. Per os beadás esetén a két hatóanyag felszívódási felezési ideje gyakorlatilag megegyezett ( $0,13 \pm 0,01$  h), amoxicillin esetében  $1,28 \pm 0,05$  h, klavulánsavnál pedig  $1,27 \pm 0,07$  h eliminációs felezési időt tapasztaltunk. A maximális plazmakoncentráció a hatóanyagok fenti sorrendjében  $3,20 \pm 0,12$  µg/ml-nek, illetve  $1,05 \pm 0,12$  µg/ml-nek adódott, amelynek eléréséhez  $0,48 \pm 0,01$  h, illetve  $0,48 \pm 0,02$  h-ra volt szükség. Az amoxicillin szájon át való biológiai hasznosulása pulykában  $60,2 \pm 2,6\%$ -nak, míg a klavulánsavé  $60,7 \pm 6,3\%$ -nak bizonyult.

A két állatfajban a hatóanyagok farmakokinetikájának összehasonlításakor számos különbséget tapasztaltunk az amoxicillin és a klavulánsav szájon át való beadását követően, valamint a klavulánsav intravénás alkalmazásakor. A két hatóanyag szájon át való biológiai hasznosulása amoxicillin esetében szignifikánsan nagyobb ( $p < 0,05$ ) volt csirkében ( $F = 63,8 \pm 2,6\%$ ), mint pulykában ( $F = 60,2 \pm 2,6\%$ ). A klavulánsav esetében hasonló jelenséget figyeltünk meg, a per os hasznosulás szignifikánsan nagyobb volt csirkében ( $F = 65,7 \pm 3,1\%$ ), mint pulykában ( $F = 60,7 \pm 6,3\%$ ). Ezek az eltérések ugyan matematikailag szignifikánsnak bizonyultak, a terápiában azonban nem jelentősek.

Érzékenységi vizsgálatainkat *E. coli*, *S. enterica* és *P. multocida* törzseken végeztük, s meghatároztuk ezekre a baktériumfajokra az aktuális MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értékeket, valamint megállapítottuk az érzékeny törzsek arányát az adott fajon belül amoxicillinre, illetve a klavulánsavval potenciált hatóanyagra. Az amoxicillin-klavulánsav kombináció alkalmazásakor *E. coli* esetében (n=103) a MIC<sub>50</sub> értéke 8 µg/ml, a MIC<sub>90</sub> értéke pedig 32 µg/ml lett. Ebben a fajban nagyfokú és gyakori rezisztenciát tapasztaltunk. Az amoxicillinre érzékeny *E. coli* törzsek aránya 41,7%, míg a klavulánsavval potenciált hatóanyagra 64,1% volt. *S. enterica* (n=118) esetében a klavulánsavval potenciózott amoxicillinre vonatkozó MIC<sub>50</sub> 1 µg/ml, míg a MIC<sub>90</sub> 2 µg/ml volt. Az amoxicillinre a törzsek 94%-a, míg az amoxicillin-klavulánsavra a törzsek 97,6%-a bizonyult érzékenynek. A *P. multocida* (n=85) esetén az amoxicillin-klavulánsav kombináció alkalmazásakor

a MIC<sub>50</sub> érték 1 µg/ml, a MIC<sub>90</sub> érték pedig 4 µg/ml volt. A vizsgálatunkba bevont törzseknél az amoxicillinre érzékeny törzsek aránya 82,3%, míg a kombinációra érzékenyeké 98,8% volt.

Stabilitási vizsgálatunkban a hatóanyagok bomlékonyságát vizsgáltuk különböző keménységi fokú ivóvízmintákban, különböző pH-értékeken, valamint fém- és műanyag itatóedényben, ivóvízben. A hatóanyagok koncentrációját saját, validált RP-HPLC-UV módszerrel határoztuk meg. Kísérletünk eredményei alapján megállapítható, hogy a klavulánsav a legtöbb kísérleti elrendezésben bomlékonyabbnak bizonyult az amoxicillinnél, mely alól csak a fémitatóban végzett vizsgálat képezett kivételt, ahol az aminopenicillin bomlása kifejezetten felgyorsult. Ajánlásaink szerint az amoxicillin-klavulánsav kombinációt lágy, közel semleges pH-jú vízben kell feloldani, majd műanyag itatóedénybe helyezni, mert ezen körülmények között biztosítható a két hatóanyag legjobb, együttes stabilitása.

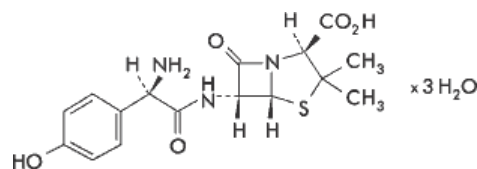


## 2. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

### 2.1. AZ AMOXICILLIN-KLAVULÁNSAV KOMBINÁCIÓ

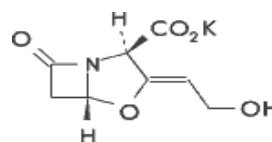
A különböző gyógyszer-kombinációk közül kiemelt jelentőséggel bírnak az antibakteriális szerek kombinációi. A helyesen megválasztott hatóanyagok esetében ugyanis kifejezett potenciózó hatás jön létre, azaz a hatékonyság fokozódik, ennek következtében a kívánt terápiás hatás eléréséhez kisebb dózis is elegendő, így csökken a nemkívánatos vagy toxikus hatások kialakulásának a veszélye. Az antibakteriális spektrum kiszélesedhet, bizonyos esetekben a bakteriosztatikus helyett baktericid hatásmód lesz jellemző a kombinációra. Az amoxicillin és klavulánsav tartalmú kombinált készítmények antibakteriális spektruma igen széles, baktericidek, és mivel csaknem atoxikusak, rövid idő alatt a humán- és az állatgyógyászatban egyaránt kedvelt szerré váltak. Az **amoxicillin** (1. ábra)  $\beta$ -laktámvázas antibiotikum, ún. szélesített spektrumú

penicillinszármazék (aminopenicillin), amelynek jellegzetessége, hogy a Gram-pozitív baktériumokkal szembeni kifejezett aktivitása mellett számos Gram-negatív baktériumfaj ellen is hatékony, érzékeny azonban a baktériumok által



1. ábra: az amoxicillin-trihidrát szerkezeti képlete

termelt  $\beta$ -laktamázokra. Hatásmechanizmusa azon alapul, hogy a bakteriális sejt falban a peptidoglikán-váz szintézisét gátolja, melynek következtében a sejt fal peptid-keresztkötéseinek kialakulása zavart szenved, az elveszti szilárdságát és cytolysis következik be. Az amoxicillin a sejt falon - elsősorban a porinszatórnákon - áthatolva a citoplazma-membrán belső felületén helyeződő, a peptidoglikán vázat felépítő enzimekhez (transzpeptidázokhoz, karboxipeptidázokhoz) kötődve fejt ki hatását. Ezen enzimeket a specifikus kötés miatt összefoglalóan penicillin-kötő fehérjéknek (penicillin binding proteins=PBP) is nevezik. A **klavulánsav** (2. ábra) az amoxicillinhez hasonlóan  $\beta$ -laktámvázas antibiotikum, amelynek azonban alig van saját antimikrobás hatása. Sokféle bakteriális  $\beta$ -laktamázhoz kovalensen kötődik, irreverzibilis módon gátolja azokat, és ezáltal megakadályozza, hogy a laktamázok az amoxicillint elbontsák. A hatásmechanizmus jellegzetességére utal, hogy a klavulánsavat ún. „önfeláldozó” vagy „suicide”



2. ábra: a kálium-klavulanát szerkezeti képlete

inhibitornak nevezik. Amikor az amoxicillint és a klavulánsavat együtt használjuk, a baktériumokat lényegében az amoxicillin pusztítja el. A különböző kombinációkban a két hatóanyag aránya a 2:1-től egészen a 7:1-ig változik az amoxicillin javára, a leggyakoribb azonban a 4:1 arány. A

kombinációs partnerek hatékony aránya azonban igen széles határok között mozog, 1:1-től 20:1-ig hatékonynak mondható.

## 2.2. AZ AMOXICILLIN-KLAVULÁNSAV KOMBINÁCIÓ HASZNÁLATA A HUMÁN- ÉS ÁLLATGYÓGYÁSZATBAN

A klavulánsavval potencírozott amoxicillin baktericid hatásmóddal, nagy terápiás indexszel és széles antibakteriális spektrummal rendelkező antibiotikum. Kedvező tulajdonságai következtében a humán- és az állatgyógyászatban mind szájon át, mind parenteralisan alkalmazva elterjedten használják.

*Emberben* a kombináció a fekvő- és járóbeteg-ellátás egyik legfontosabb gyógyszere. Kiváló szájon át való biológiai hasznosulása következtében járóbetegek esetén is jól alkalmazható, naponta kétszeri adagolással. Számos fertőző betegség esetén - mint a felső- és alsó légúti megbetegedések (pharyngitis, tracheitis, bronchitis, pneumonia), otitis media, húgyúti és ivarszervi fertőzések, bőr- és lágyrészfertőzések, harapott sebek - igénybe vehető. Kórházi körülmények között intravénásan is alkalmazható, az injekciós oldatot a klavulánsav vizes környezetre való kifejezett érzékenysége miatt frissen kell elkészíteni.

*Kutyában és macskában* a kombináció felhasználható számos bakteriális eredetű légzőszervi, húgyúti, ivarszervi, emésztőszervi, bőr-, illetve lágyrészfertőzés terápiájára, bőrfertőzések esetén a penicillinázt termelő *S. intermedius* és *S. aureus* ellen is hatékony. Az antibiotikum mind szájon át, mind parenteralisan igénybe vehető. A szájon át való alkalmazás esetében a minimális dózis 12,5 mg/ttkg naponta kétszer. Az olajos injekciók im. és sc. dózisa 8,75 mg/ttkg naponta egyszer. Húsevőkben a mellékhatások ritkán fordulnak elő, dysbacteriosis csak elvétve figyelhető meg. Ez a tény, illetve a hatóanyagok egyszerű alkalmazhatósága miatt a kombináció a társállatpraxis egyik leggyakrabban igénybevett gyógyszere.

*Kérődzőkben* az amoxicillin-klavulánsav kombináció alkalmazható légzőszervi, emésztőszervi, lágyszervi, húgy-ivarszervi, illetve egyéb szisztémás fertőzések gyógykezelésére. Szarvasmarhában adagja intramuscularisan 5-12,5 mg/ttkg, míg kifejlett bendőflórával nem rendelkező borjakban 5-12,5 mg/ttkg szájon át 12 óránként. A magasabb dózist *E. coli* okozta fertőzésekben javasolják (Constable és mtsai. 2004, Giguere és mtsai. 2006., Soback és mtsai. 1987). A kombináció használható továbbá klinikai mastitis gyógykezelésére, mely esetekben az önálló tőgyinfúziós kezelés hatékonyságát javítja a párhuzamosan intramuscularisan is alkalmazott hatóanyag (Perner és mtsai. 2002). Kiskérődzőkben a kombináció javallott heveny pasteurellosis, illetve egyéb tápigényes baktériumok okozta kórképek terápiájára 8,75 mg/ttkg im. dózisban (Giguere és mtsai. 2006).

*Sertésben* a kombináció alkalmazható szájon át és parenteralisan adva salmonellák és *E. coli* okozta gyomor-bélrendszeri fertőzések, tápigényes baktériumok, staphylococcusok, illetve streptococcusok okozta légzőszervi megbetegedések, valamint lágyrész-fertőzések, illetve az MMA-szindróma terápiájára. A kombináció dózisa 12,5-25 mg/ttkg szájon át, valamint 8,75 mg/ttkg intramuscularisan adagolva.

Kérődzőkben és sertésben az Európai Unió felügyeleti hatósága, az EMEA-CVMP (*European Medicines Agency – Committee of Veterinary Medicinal Products*) által megállapított MRL-érték érvényes az EMEA/MRL/776/01-FINAL bejegyzés alatt, mely szerint a fenti állatfajokban ehető szövetekre és tejre végleges maximális maradvány-anyag szintet állapítottak meg, továbbá a hatóanyagok az 2377/90 EK-rendelet szerinti I-es Annexbe sorolhatók.

*Lóban* az amoxicillint önmagában intramuscularisan 10-15 mg/ttkg dózisban 6 óránként alkalmazva javasolják *R. equi* okozta pneumonia esetén. Szájon át adva a hatóanyag nem alkalmazható kifejezett vastagbél-flórával rendelkező lovakban a fatális vakbél-dysbacteriosis veszélye miatt. A fentiekben leírt indikáció mellett a hatóanyag alkalmazása ebben az állatfajban ritka a Gram-negatív baktériumok körében elterjedt rezisztencia miatt. Gram-pozitív baktériumok okozta fertőzések esetén a bélflórát kevésbé károsító penicillin-G, illetve ennek származékai kerülnek gyakrabban felhasználásra. A Gram-negatív baktériumok elleni rezisztencia áttörésére bakteriológiai szempontból a klavulánsavval való kombináció lenne elméletileg igénybe vehető, azonban a kombináció alkalmazása lóban mind szájon át, mint parenteralisan ellenjavallt (Giguere és mtsai. 2006). Ennek háttérében a gyakori, és számos esetben végzetes kimenetelű dysbacteriosis kialakulásának veszélye áll, amely jelenség nem csak a készítmény szájon át való alkalmazását követően jelentkezhet, hanem a hatóanyagok parenteralis alkalmazása esetén is, amikor azok a bélnedvvel is kiválasztódnak.

*Házityúkban és pulykában*, valamint egyéb baromfifajokban az EMEA-CVMP klavulánsavra nem állapított meg hivatalos MRL-értéket, melynek következtében a hatóanyag élelmiszer-termelő baromfifajokban nem alkalmazható az Európai Unió területén (továbbá pl. az USA-ban sem, ahol az FDA sem állapított meg tolerancia-határértéket). Magyarországnak az Európai Unióhoz való csatlakozását megelőzően az amoxicillin-klavulánsav kombináció forgalomban volt hazánkban, elsősorban Gram-negatív kórokozók (*E. coli*, salmonellák, pasteurellák), valamint *S. aureus* és *C. perfringens* okozta fertőzések tömeges kezelésére, ivóvízben, 12,5-25 mg/ttkg dózisban. A fent leírtak alapján azonban jelenleg az Európai Unióban, így hazánkban is csak az önálló amoxicillin vehető igénybe, a klavulánsavval potenciált hatóanyag nem alkalmazható. A rezisztencia gyakoriságának növekedése, a bakteriális  $\beta$ -laktamáz enzimek egyre növekvő száma következtében azonban az amoxicillin egyre kevésbé hatékony a legtöbb fontos baromfi-patogén kórokozó ellen. A klavulánsavval potenciált hatóanyagra ugyanakkor ezen

mikroorganizmusok jóval szélesebb köre fogékony, így a jövőben egy lehetséges választás lehet a baromfi fertőző kórképeinek kezelésére, ha az MRL-értéket megállapítják. A kombinációt ugyanis kedvező tulajdonságai és kielégítő vízdoldékonysága következtében számos fertőző betegség gyógykezelésére lehetne igénybe venni a baromfiágazatban. Házityúokban és pulykában alkalmas lehet olyan komoly gazdasági jelentőséggel bíró fertőző betegségek, mint a salmonellák által előidézett baromfityphus és paratyphus, *E. coli* okozta kórképek (légszakgyulladás, coli-septicaemia, enteritis, coli-granulomatosis stb.), *P. multocida* okozta baromficholera, valamint staphylococcosisok (*S. aureus*, *S. epidermidis*, illetve *S. hyicus* okozta vérfertőzés, ízület- és bőrgyulladás), *C. perfringens* A és C okozta fertőző elhalásos bélgyulladás; *C. colinum* okozta fekélyes bélgyulladás („fűrjbetegség”); *E. rhusiopathiae* okozta kórképek, *B. avium* által okozott baromfi-bordetelosis („pulykacoryza”) és egyéb érzékeny mikroorganizmusok okozta kórképek gyógykezelésére.

### 2.3. CÉLKITŰZÉS

Az antibakteriális szerek kombinálásakor a szervezetben való hatékonyság két alapvető feltétele, hogy a fertőzést okozó baktériumok a hatóanyag-kombinációval szemben érzékenyek legyenek, valamint, hogy a hatóanyagok farmakokinetikai tulajdonságai az adott állatfajban lehetővé tegyék az adott antibiotikumoknak – hatékony arányban - a fertőzés helyére való eljutását. Az amoxicillin-klavulánsav kombinációval ugyan már végeztek **farmakokinetikai** vizsgálatokat házityúokban és pulykában, azonban szájon át való beadást követő biológiai hasznosulást illetően nincsenek irodalmi adataink, holott a baromfiágazatban – a kombináció esetleges engedélyezését követően – a medikált ivóvízzel történő per os kezelés lehet a legfontosabb gyógyszer-alkalmazási mód. Az irodalmi adatokban továbbá jelentős ellentmondások is találhatóak a farmakokinetikai paraméterek tekintetében. Jelen dolgozat egyik célja a fent említett adatok kiegészítése és pótlása, a per os biológiai hasznosulás meghatározása, valamint az irodalomban fellelhető ellentmondások tisztázása. Célunk volt továbbá magyarországi házityúk- és pulykaállományokat megbetegítő *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *E. coli* és *P. multocida* baktériumtörzsek **érzékenységi vizsgálata** amoxicillinre és az amoxicillin-klavulánsav kombinációra. Ezen vizsgálataink során meghatározásra kerültek a fenti baktériumfajokra jellemző aktuális MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub>-értékek, amelyek elengedhetetlenek a kombináció terápiás hatékonyságának elemzéséhez. Nem található ugyanis naprakész hazai információ ezen értékekkel kapcsolatban. Célkitűzésünkben szerepelt továbbá az amoxicillin-klavulánsav kombináció feloldást követő **stabilitásvizsgálata**. A hatóanyagokból készített medikált ivóvízben ugyanis a hatóanyagok bomlása jelentősen felgyorsul, az idő előrehaladtával így jelentősen csökken a felvett gyógyszer mennyisége, következésképpen a kombináció hatékonysága. Vizsgálataink során különböző keménységi fokú, pH-jú oldatokban,

valamint fém- és műanyag itatóedényben vizsgáltuk a kombinációs partnerek bomlását. A fenti baktériumokra jellemző érzékenységi adatok, valamint a kombináció farmakokinetikai paramétereinek ismeretében a megfelelő dózis megválasztásához szándékoztunk fontos információkkal szolgálni, miközben bemutatjuk, hogy a klavulánsavval potenciált hatóanyag képes a legtöbb laktamáz-termelő baktériumtörzs esetén a kialakult rezisztenciát áttörni, így a terápia-rezisztenciát megszüntetni. A dolgozatban továbbá a gyógyszer maximális stabilitását biztosító körülményeket is közzétesszük, melyek hozzájárulhatnak a kombináció jövőbeni alkalmazásának optimalizálásához.

### 3. AZ AMOXICILLIN-KLAVULÁNSAV KOMBINÁCIÓ FARMAKOKINETIKÁJA HÁZITYÚKBAN ÉS PULYKÁBAN INTRAVÉNÁS ÉS SZÁJON ÁT VALÓ ALKALMAZÁST KÖVETŐEN

#### 3.1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az amoxicillin és a klavulánsav kombinációjában előnyös, hogy a két hatóanyag farmakokinetikai tulajdonságai a legtöbb állatfajban nagyon hasonlóak, s ez tovább növeli hatékonyságukat. Az amoxicillin a bélből állatfajonként jelentősen eltérő mértékben szívódik fel, a szájon át való biológiai hasznosulási értékek általában jobbakként, mint az ampicillin esetében (l. 1. táblázat).

1. táblázat: az ampicillin és az amoxicillin szájon át való biológiai hasznosulása a különböző állatfajokban és emberben

Faj	Felszívódás (%)	
	Ampicillin	Amoxicillin
Ló	0-1%	5-10%
Kutya	20-45%	64-77%
Sertés	-	28-38%
Borjú	-	29-32%
Kiskérődzők	~7%	~27%
Brojlercsirke	-	59-68%
Ember	30-60%	80-95%

A lovakat kivéve a gyógyszer a bélből általában jól, vagy kellő mértékben felszívódik, és ezt - szemben az ampicillinnel - az etetés alig befolyásolja. A klavulánsav felszívódása hasonló mértékű, mint az amoxicilliné. Mivel *lóban* (Ensink és mtsai. 1992, Montesissa és mtsai. 1988) az amoxicillin csak csekély mértékben szívódik fel, a bélbe antibiotikumok a bélfloórát kifejezetten károsítják, melynek következménye súlyos, gyakran kezelhetetlen álhártyás colitis lehet. Mindezek következtében a szájon át történő használat ellenjavallt, az amoxicillin helyett az ampicillin ún. „prodrug” formái, a bacampicillin és a pivampicillin alkalmazhatók. *Sertésben* (Agerso és mtsai. 1998, Reyns és mtsai. 2007) a felszívódás korlátozott, amelynek oka, hogy az amoxicillin döntő mennyisége aktív transzporttal, egy carrier-fehérje segítségével szívódik fel a béltraktusból, és ez a mechanizmus telíthető. Tovább csökkenti a felszívódást a bélnedv és a bélfal enzimeinek inaktiváló hatása, mely jelenség egy új fejlesztésű gyógyszerformával, az ún. mikrogranulátummal leküzdhető (Anfossi és mtsai. 2002), így a per os biológiai hasznosulás növelhető. *Kiskérődzőkben* (Carceles és mtsai. 1995, Soback és mtsai. 1987) a kísérletesen mért per os biológiai hasznosulás szintén

alacsony, a gyakorlatban azonban ezekben a fajokban a szájon át való applikálás amúgy is kontraindikált. *Húsevőkben* (Küng és mtsai. 1994) a felszívódás nagyon jó, egyes esetekben a 80-90%-ot is meghaladja. *Emberben* a per os biológiai hasznosulás amoxicillinnél csaknem teljes (~90%), klavulánsavnál kissé alacsonyabb (Witkowski és mtsai. 1982), ezért a humán járóbeteg ellátás egyik legfontosabb antibakteriális gyógyszere. A *növényevő rágcsálók és a nyúl* bélflórája a szélesített spektrumú penicillinekre igen kifejezett érzékenységet mutat, ezért ezen állatfajokban a kombináció alkalmazása kontraindikált.

***Házityúkban és pulykában*** a klavulánsav szájon át való adást követő biológiai hasznosulásáról és farmakokinetikai paramétereiről nem áll rendelkezésre irodalmi adat. Más állatfajok kinetikai paramétereiből extrapolálni helytelen, hiszen a madarak emésztésélettana, a víz- és táplálékfelvétel módja, az emésztőtraktus felső részének anatómiája, valamint a felszívódás helye és mértéke jelentősen különbözik az emlősökétől. Ha ennek ellenére emlősökre vonatkozó adatokból becsüljük meg a szükséges gyógyszeradagot, számítanunk kell arra, hogy az aluldozírozás hatástalan vér- és szöveti szintet eredményez, valamint elősegíti a rezisztens mikrobák térhódítását, a túl nagy dózis pedig toxikus lehet, bár ez utóbbi esélyét a kombináció széles terápiás indexe jelentősen csökkenti. A tyúkban és pulykában végzett korábbi farmakokinetikai vizsgálatokat elemezve elmondható, hogy a legtöbb kinetikai paraméter a különböző szerzők esetében jelentős eltéréseket mutat, pedig ezen mutatók ismerete nélkülözhetetlen a szer helyes terápiás használatához. Anadón és mtsai (1996) brojlercsirkéken végzett vizsgálatainak eredményei jelentősen eltérnek a többi szerző adataitól (2. táblázat). A kutatócsoport 8-8 hím brojlercsirkét kezelt amoxicillinnel 10 mg/ttkg dózisban intravénásan és szájon át, ivóvízben. Az adagolás után több időpontban vért vettek, és RP-HPLC módszerrel határozták meg az amoxicillin plazmakoncentrációját, amelynek leírására a kétrekeszes kinetikai modell volt a legalkalmasabb. A per os gyógyszerbevitelt követően a biológiai hasznosulás kivételével az egyéb kinetikai változókat (maximális plazmakoncentrációt, az ennek eléréséhez szükséges időt, valamint a megoszlási és eliminációs felezési időket) többszörösen nagyobbobnak találták, mint más szerzők (ld. 2., 3., 4. és 5. táblázat). El-Sooud és mtsai (2004), valamint Carceles és mtsai (1995) ugyanis lényegesen kisebb  $C_{max}$ ,  $t_{max}$ ,  $t_{1/2}$  értékekről számoltak be. Ennek következtében az Anadón és mtsai által ajánlott optimális adagolási gyakoriság 24 óra, míg El-Sooud és mtsai szerint 6 óra. Ezek az igen jelentős különbségek nem magyarázhatók a kísérleti elrendezéssel vagy az alkalmazott módszerekkel, mivel azok a leírás szerint lényegében azonosak voltak.

2. táblázat: az amoxicillin (D=10 mg/ttkg) fontosabb farmakokinetikai paraméterei brojlersirkében (n=16) Anadón és mtsai. szerint (1996)

	<i>Intravénás</i>	<i>Per os</i>
$C_{max}$ (µg/ml)	-	160,40±4,67
$t_{max}$ (h)	-	1,00±0,06
$t_{1/2ab}$ (h)	-	0,30±0,02
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,23±0,01	1,00±0,10
$t_{1/2\beta}$ (h)	8,17±0,31	9,16±0,60
$V_d$ (l/kg)	0,049±0,002	0,054±0,003
$AUC_{0-\infty}$	2449,3±174,8	1534,61±14,9

El-Sooud és mtsai (2004) 10-10 klinikailag egészséges brojlersirkén vizsgálták az amoxicillin farmakokinetikáját egyszeri (dózis: 10 mg/ttkg) iv., im. és p.o. applikációját követően. A plazmakoncentráció-idő görbét elemezve megállapították, hogy a gyógyszer viselkedése az egyszeri iv. adagolást követően a kétrekeszes nyitott modellel írható le legpontosabban. A gyógyszerbeadást követő 8. és 10. órában már egyik applikációs mód esetében sem volt detektálható mennyiségű amoxicillin a plazmában. Intramuscularis adagolást követően a per os adagoláshoz képest szignifikánsan magasabb  $C_{max}$ - és AUC-értékeket, valamint jobb biológiai hasznosulást kaptak. Eredményeik a 3. táblázatban láthatók.

3. táblázat: Az amoxicillin (D=10 mg/ttkg) fontosabb farmakokinetikai paraméterei brojlersirkében (n=20) El-Sooud és mtsai szerint (2004)

	<i>Intravénás</i>	<i>Intramuscularis</i>	<i>Per os</i>
$C_{max}$ (µg/ml)	-	5,2±0,23	3,5±0,3
$t_{max}$ (h)	-	0,26±0,04	0,49±0,07
$t_{1/2ab}$ (h)	-	0,054±0,03	0,16±0,02
$\alpha$ (1/h)	15,08±0,79	-	-
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,047±0,002	-	-
$\beta$ (1/h)	0,65±0,02	-	-
$t_{1/2\beta}$ (h)	1,07±0,02	1,09±0,034	1,13±0,06
$V_d$ (l/kg)	1,12±0,03	-	-
$Cl$ (l/h/kg)	0,8±0,06	-	-
$AUC_{0-\infty}$ (mg/h/l)	13,85±0,14	10,67±0,43	8,43±0,63
$F$ (%)	-	77,21±3,47	60,92±2,76



Carceles és mtsai (1995) az amoxicillin-klavulánsav kombináció farmakokinetikáját vizsgálták brojlercsirkén és pulykán intramuscularis és intravénás beadást követően, a szájon át való alkalmazás vizsgálata nélkül. A kombinációt 15-15 csirkének és pulykának 25 mg/ttkg adagban (20 mg amoxicillin és 5 mg klavulánsav testtömeg-kilogrammonként) adagolták iv. és im. A vérvételek után a plazmakoncentrációkat RP-HPLC módszerrel, UV-detektálással mérték. Mivel kísérleteikben a per os adagolást nem vizsgálták, az ezzel kapcsolatos értékek nem kerültek meghatározásra, a többi farmakokinetikai paraméter azonban El-Sooud és mtsai (2004) méréseivel van összhangban. A klavulánsav kinetikai jellemzői nagyon hasonlítanak az amoxicillinéhez, amely a kombináció egyik fontos jellemzője. A kutatócsoport szerint a két szer farmakokinetikai paramétereit a két baromfifajban a 4. és 5. táblázat mutatja be.

**4. táblázat: Az amoxicillin-klavulánsav (4:1) kombináció (D=25 mg/ttkg) intravénás és intramuscularis beadását követő kinetikai paraméterek csirkében (n=15) Carceles és mtsai szerint (1995)**

	<i>Intravénás</i>		<i>Intramuscularis</i>	
	<b>Amoxicillin</b>	<b>Klavulánsav</b>	<b>Amoxicillin</b>	<b>Klavulánsav</b>
<b>C<sub>max</sub> (µg/ml)</b>	-	-	7,99±1,01	2,57±0,18
<b>t<sub>max</sub> (h)</b>	-	-	0,38±0,05	0,32±0,04
<b>t<sub>1/2ab</sub> (h)</b>	-	-	0,09±0,02	0,08±0,01
<b>t<sub>1/2α</sub> (h)</b>	0,05±0,01	0,05±0,00	-	-
<b>t<sub>1/2β</sub> (h)</b>	1,03±0,11	0,98±0,05	1,31±0,09	1,26±0,07
<b>Vd (l/kg)</b>	1,75±0,09	1,42±0,11	2,63±0,22	2,10±0,12
<b>Cl (l/h/kg)</b>	1,19±0,08	1,01±0,06	-	-
<b>MRT (h)</b>	1,17±0,14	1,10±0,06	1,51±0,13	1,46±0,15
<b>AUC<sub>0-∞</sub> (mg/h/l)</b>	16,75±2,31	4,97±0,63	14,32±1,22	4,32±0,99
<b>F (%)</b>	-	-	85,49±5,42	86,92±5,85

**5. táblázat: Az amoxicillin-klavulánsav (4:1) kombináció (D=25 mg/ttkg) intravénás és intramuscularis beadását követő kinetikai paraméterek pulykában (n=15) Carceles és mtsai szerint (1995)**

	<i>Intravénás</i>		<i>Intramuscularis</i>	
	<b>Amoxicillin</b>	<b>Klavulánsav</b>	<b>Amoxicillin</b>	<b>Klavulánsav</b>
<b>C<sub>max</sub> (µg/ml)</b>	-	-	8,03±1,23	2,39±0,21
<b>t<sub>max</sub> (h)</b>	-	-	0,38±0,04	0,37±0,03
<b>t<sub>1/2ab</sub> (h)</b>	-	-	0,09±0,02	0,08±0,01
<b>t<sub>1/2α</sub> (h)</b>	0,06±0,01	0,06±0,00	-	-
<b>t<sub>1/2β</sub> (h)</b>	1,12±0,09	1,12±0,03	1,44±0,1	1,41±0,07
<b>Vd (l/kg)</b>	1,61±0,09	1,33±0,11	2,72±0,28	2,04±0,17
<b>Cl (l/h/kg)</b>	1,00±0,09	1,01±0,06	-	-
<b>MRT (h)</b>	1,17±0,14	0,83±0,06	1,86±0,17	1,8±0,15
<b>AUC<sub>0-∞</sub> (mg/h/l)</b>	19,97±2,00	6,02±1,11	15,27±1,54	5,26±1,03
<b>F (%)</b>	-	-	77,59±5,22	76,26±6,43

Az intravénásan adott, illetve a felszívódás után keringésbe jutott amoxicillin és klavulánsav a fenesztrált kapillárisokon át kiáramlanak az interstitialis térbe, és így megoszlásuk a test csaknem minden területére kiterjed. Terápiás koncentrációt érnek el többek között a bőrben, a bronchus-szekrétumban, a nyirokcsomókban és kiválasztódnak a bélnedvvel is. Az amoxicillin fehérvérjékötődése brojlercsirkék plazmájában 1,63% és 15,5% között mozgott 0,39-25 µg/ml közötti amoxicillin-plazmakoncentrációk mellett (El-Sooud és mtsai. 2004). Látszólagos eloszlási térfogatuk a legtöbb állatfajban és emberben viszonylag alacsony, a 150-320 ml/kg intervallumba sorolható (Giguere és mtsai 2006, Küng és mtsai 1994), klavulánsav esetében ez az érték általában alacsonyabb, mint amoxicillinnél. Madárfajokban a megoszlási térfogat jóval magasabb, az 1,12-1,75 l/kg értéktartományba esik mindkét hatóanyag esetén, klavulánsavnál az érték alacsonyabb (Carceles és mtsai 1995, El Sooud és mtsai 2004). Ez a jelenség a többi állatfajhoz képest jobb szöveti penetrációra utal. A hatóanyagok áthatolása a speciális barriereken nem kielégítő, a liquorban nem képesek terápiás koncentrációt elérni, csupán abban az esetben, ha a központi idegrendszerben gyulladás van. Az amoxicillin döntő mennyisége (~80%) változatlan aktív formában a vizelettel ürül, a maradék 20% inaktív metabolit formájában választódik ki. A klavulánsav nagyobb hányada metabolizálódik, a májat bizonyos, arra érzékeny egyedekben immunoallergiás alapon károsíthatja (Hautekeete és mtsai 1999). A vesében glomerulus-filtrációval

és tubuláris szekrécióval is kiválasztódó gyógyszerkombináció olyan nagy koncentrációt érhet el a vizeletben, hogy az egyébként kevésbé érzékeny baktériumok (*E.coli*, klebsiellák, proteusok) esetében is biztos baktericid hatás jelentkezik. A nagyfokú renális exkréció miatt, a beszűkült veseműködésű állatban bár a kiválasztás késleltetett, dóziskorrekcióra mégis ritkán van szükség a gyógyszer alacsony toxicitása miatt.

A kombinációs készítményekben az amoxicillin sóformája nagymértékben befolyásolja a szer farmakokinetikai viselkedését, és ennek klinikai vonzatai is vannak. Az *amoxicillin-nátriumsó* vízben jól oldódik, szájon át és parenteralisan egyaránt adható. Felszívódása gyors, a szérumszúcskoncentrációja magasabb, a biológiai felezési idő rövidebb. Az *amoxicillin-trihidrát* ezzel szemben vízben mérsékeltén oldódik, intravénásan nem adható. Lassabb felszívódás, alacsonyabb csúcskoncentráció jellemzi. Az amoxicillin sóformáinak összehasonlítása a 6. táblázatban látható.

**6. táblázat: Az amoxicillin nátrium- és trihidrát-sójának összehasonlítása gyakorlati szempontok alapján**

<b>tulajdonságok</b>	<b>amoxicillin-nátriumsó</b>	<b>amoxicillin-trihidrát</b>
vízoldékonyság	jó	mérsékelt
adagolás módja	per os/parenteralis (iv.)	per os/parenteralis (de iv. tilos!)
felszívódás	gyors	lassabb
$C_{max}$	magas	alacsonyabb
biológiai $t_{1/2}$	rövid	hosszabb
javasolt adagolási intervallum	4-6 óránként	6-12 óránként

## 3.2. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 3.2.1. A brojlersirkéken végzett farmakokinetikai vizsgálat

**A kísérlet leírása:** Az amoxicillin-klavulánsav kombináció farmakokinetikáját brojlersirkében kétfázisú, kéthetes cross-over vizsgálatban elemeztük. Az első fázisban az állatok felét per os, másik felét intravénásan kezeltük a kombinációval. Két hét elteltével, vagyis a kísérlet második fázisában megcseréltük a beadási módokat: az addig po. kezelt állatokat iv., az iv. kezelt állatokat po. kezeltük. A vérvételeket követően RP-HPLC módszerrel, UV-detektálással meghatároztuk a hatóanyagok plazmakoncentrációját. Az eredmények alapján a legjobban illeszkedő farmakokinetikai modell alkalmazásával meghatároztuk az adott beadási módra jellemző farmakokinetikai paramétereket, valamint megadtuk a szájon át való biológiai hasznosulást.

**A kísérleti állatok:** A kísérletbe 12, Ross fajtájú, konvencionális státuszú, vakcinázott jércét vontunk be. Az állatok érkezéskor 6 hetesek voltak, testtömegük  $1,5 \pm 0,08$  kg volt. Az állatok a SZIE-ÁOTK Gyógyszertani és Méregtani Tanszék GLP-minősítésű állatházában kerültek elhelyezésre 5 nappal a kísérlet megkezdése előtt. Itt gyógyszermentes tápot és ivóvizet kaptak *ad libitum*. A csirkéket a kísérletet megelőzően 12 órán át koplaltattuk. A randomizálás során két, egyenként 6-6 állatot tartalmazó csoportot alakítottunk ki. A randomizálást az állatok testtömegét alapul véve, a RANDOM nevű számítógépes szoftver segítségével végeztük. A csoportok közti hasonlóságot Student-féle t-próbával ellenőriztük. Az állatkísérleteket a SZIE-ÁOTK Állatvédelmi Bizottsága engedélyezte.

#### A kísérlet menete

##### a. Az állatok kezelése

A *per os* csoport 6 állatának kezelése *Augmentin® oralis szuszpenzióval* (GlaxoSmithKline, Egyesült Királyság) történt, az alkalmazott egyszeri dózis a kombinációra 12,5 mg/ttkg (10 mg/ttkg amoxicillin-trihidrát + 2,5 mg/ttkg kálium-klavulanát) volt. A dózis megválasztása az irodalmi adatok (Anadón és mtsai. 1996, El-Sooud és mtsai 2004) alapján, valamint a korábban hazánkban forgalomban lévő készítmény adagjának figyelembevételével választottuk meg. A gyógyszer elkészítése után a szuszpenziót a hatóanyag leülepedésének megakadályozása céljából mágneses keverő segítségével folyamatosan kevertük. Az előzetesen 12 órán át koplaltatott állatoknak nyelőcsőszonda segítségével, közvetlenül a begybe adtuk be a kiszámolt gyógyszer mennyiséget.

Az *intravénás* csoport tagjait *Augmentin® intravénás injekcióval* (GlaxoSmithKline, Egyesült Királyság) kezeltük, amelyben a kombináció adagja szintén 12,5 mg/ttkg (10 mg/ttkg amoxicillin-

nátrium + 2,5 mg/ttkg kálium-klavulanát) volt. A felhasznált gyógyszerek leírását a 7. táblázat tartalmazza. A gyógyszer desztillált vízben való feloldása után a kiszámolt mennyiséget a jobb oldali *v. brachialis* keresztül adtuk be az állatoknak.

A kétételes „washout” periódus elteltével, a második fázis során a két csoportot, vagyis a gyógyszerbeadás módját felcseréltük. A kísérlet ideje alatt az állatokon nem észleltünk semmiféle kóros klinikai tünetet, sem pedig csökkent étvágyat, illetve megváltozott vízfogyasztást.

**7. táblázat: a farmakokinetikai kísérletek során felhasznált gyógyszerek**

a beadás módja	szájon át	intravénásan
a gyógyszer neve	Augmentin 156 mg/5 ml orális szuszpenzió	Augmentin 600 mg intravénás injekció
gyártó	Glaxo SmithKline	Glaxo SmithKline
hatóanyagok	amoxicillin-trihidrát kálium-klavulanát	amoxicillin-Na kálium-klavulanát
fizikai tulajdonságok	fehér, vízben oldódó kristályos por	fehér, vízben oldódó, steril kristályos por
tárolási feltételek	szobahőmérsékleten (15-25 °C), száraz helyen, fénytől védve tartandó	szobahőmérsékleten (15-25 °C), száraz helyen, fénytől védve tartandó
fő farmakológiai hatás	antibiotikum-kombináció	antibiotikum-kombináció

#### b. Vérvételek

Mindkét csoport minden tagjából, zárt vérvételi módszerrel 2 ml vért vettünk heparinózott csövekbe a bal oldali *v. brachialis*-ből a gyógyszerbeadás előtt (0. perc) és azt követően az alábbi időpontokban: 5., 10., 20., 30., 45., 60., 90., 120., 150. perc, valamint 3., 4., 5., 6., 7. és 8. óra.

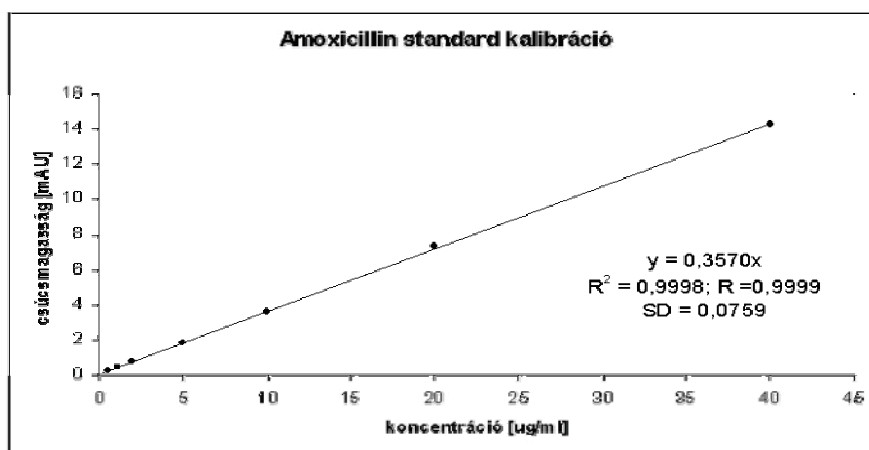
#### c. Centrifugálás, tárolás

A vérvételt követően a vérmintákat 2000/p fordulatszámon 10 percig centrifugáltuk, majd a plazmamintákat -80 °C-ra hűtöttük és ezen a hőmérsékleten tároltuk az RP-HPLC-mérésig.

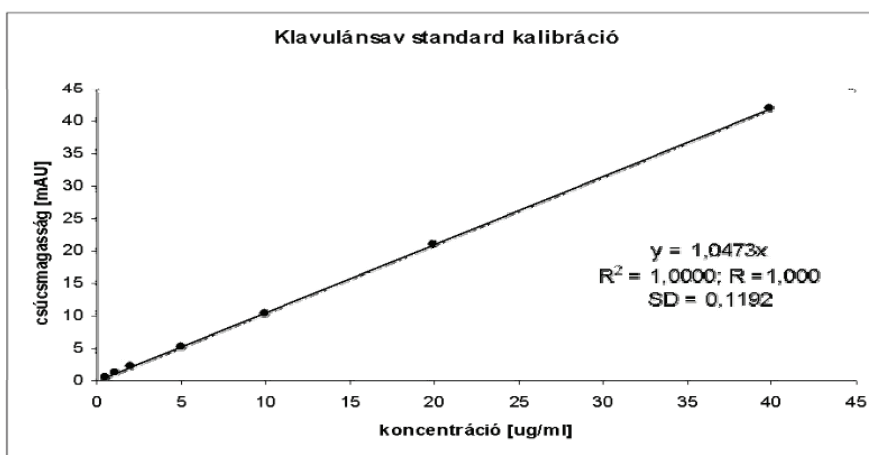
#### d. Mintaelőkészítés és HPLC-mérés

A minták metanollal való fehéjmentesítését 200 µl plazmához 400 µl metanol (HPLC-grade) adásával végeztük. Az így kapott mintát 1 perc vortex-keverés után 10000 rpm-es fordulatszámon 10 percig centrifugáltuk. Ezt követően az amoxicillin és a klavulánsav plazmakoncentrációját RP-HPLC módszerrel határoztuk meg, Hoizey és mtsai (2002) módszere alapján, Hewlett-Packard 1090A műszerrel, Routin C<sub>18</sub>, 10 µm, 250 x 4,0 mm-es kolonnákon, 210 nm hullámhosszon, UV-DAD detektorral. A mozgófázis 5 v/v% metanolt és 95 v/v% 0,01M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-ot tartalmazott, kémhatását foszforsav segítségével állítottuk be pH 7,0-ra. A két hatóanyag koncentrációját

egymással párhuzamosan, egy mérés során határoztuk meg. Az injektlási térfogat 50  $\mu$ l, az áramlási sebesség 1,0 ml/perc volt. A 99%-os tisztaságú kristályos amoxicillin (Sigma Aldrich Co., USA) és a 96%-os tisztaságú kristályos klavulánsav (Fluka Inc., USA) kontroll plazmamintákhoz való adásával 40, 20, 10, 5, 2, 1, és 0,4  $\mu$ g/ml koncentrációjú munkaoldatokat kaptunk. Ezen modell segítségével készítettük el a későbbi mérésekhez használt hét pontos kalibrációs görbéket, amelyek a 3. és 4. ábrán láthatók. A hatóanyagot nem tartalmazó, ún. „blank” plazma kromatogramja a Függelék 1. ábráján, míg a hatóanyagokat meghatározott mennyiségben tartalmazó ún. „spike”-olt minta kromatogramja a Függelék 2. ábráján látható.



3. ábra: az amoxicillin standard kalibrációs egyenese



4. ábra: a klavulánsav standard kalibrációs egyenese

## A módszer validálása

### Specifikusság

Módszerünknel kimondható, hogy nem volt interferencia a mátrixszal (a hatóanyagok retenció idejétől számítva  $\pm 1,5\%$ -ban nincs zavaró komponens), és a kontroll mintánál a kapott jel kisebbnek bizonyult, mint a kimutathatósági határérték (LOD).

### Linearitás

Az amoxicillin és klavulánsav linearitását a 0,4–40 µg/ml-es koncentráció-tartományban hétpontos kalibráció alapján vizsgáltuk. A lineáris regressziós analízis eredményei a 8. és 9. táblázatban láthatók, amelyből kitűnik, hogy a módszer az adott koncentráció-tartományban lineáris ( $r \geq 0,999$ ).

**8. táblázat: amoxicillin esetében a korrelációs koefficiens, a görbe iránytangense és a szórás**

r	A <sub>1</sub> (iránytangens)	SD
0,99914	0,0753	0,0248

**9. táblázat: klavulánsav esetében a korrelációs koefficiens, a görbe iránytangense és a szórás**

r	A <sub>1</sub> (iránytangens)	SD
0,99997	0,1965	0,0260

### Visszanyerés

A visszanyerés vizsgálatára 3-3 különböző koncentrációban elkészített amoxicillin-trihidrát (2, 5, 10 µg/ml) és kálium-klavulanát (2, 5, 10 µg/ml) oldatot használtunk. Ezeket a kontroll mintához adtuk, majd a módszer segítségével meghatároztuk a hatóanyagok koncentrációit. Eredményeink a Függelék 1. és 2. táblázatában láthatók, amelyekből kiolvasható, hogy a visszanyerés (%) minden esetben 95% és 105% között volt.

### Ismételhetőség és pontosság

Az ismételhetőség és a pontosság vizsgálatára 3-3 különböző koncentrációban elkészített amoxicillin-trihidrát (2, 5, 10 µg/ml) és kálium-klavulanát (2, 5, 10 µg/ml) oldatot használtunk. A módszer ismételhetőségére és pontosságára vonatkozó adataink a Függelék 1. és 2. táblázatában olvashatók. A fenti adatokból következik, hogy az általunk kapott variációs koefficiens (CV) és pontosság értékek kielégítik a kívánt követelményeket. ( $< 10\%$ )

### Kimutathatósági és meghatározási határérték (LOD és LOQ)

Vizsgálataink során az amoxicillin és a klavulánsav kimutathatósági határértékét az ún. *jel/zaj arány* alapján számítottuk. Feltételeink alapján  $h_{LOD}=3N$ ,  $h_{LOQ}=10N$ , ahol  $N=a$  zaj csúcsmagassága. A két vegyület LOD és LOQ értékei a 10. táblázatban olvashatók.

**10. táblázat : LOD és LOQ értékek: amoxicillin**

	LOD(µg/ml)	LOQ(µg/ml)
Amoxicillin	0,05	0,16
Klavulánsav	0,03	0,08

### Stabilitás

A stabilitási vizsgálatokhoz 20 µg/ml koncentrációban amoxicillint és 20 µg/ml koncentrációban klavulánsavat tartalmazó modell plazmamintát készítettünk, melyet -80°C-on 2 hónapig tároltunk. Méréseink alapján ezen a hőmérsékleten amoxicillin esetében -0,51%, klavulánsav esetében -1,02% hatóanyag-csökkenést tapasztaltunk a 2 hónapos mérési intervallum alatt.

### **e. Farmakokinetikai paraméterek meghatározása**

Irodalmi adatok alapján, valamint az Akaike és Schwarz (Akaike 1974, Schwarz 1978) kritériumoknak, továbbá az illeszkedési egyenesek regressziós együtthatóinak figyelembevételével a hatóanyagok farmakokinetikai viselkedésének jellemzésére kétrekeszes nyitott modellt vettünk igénybe, és az FDA által elismert Kinetica<sup>®</sup> 4.4 (Thermo Scientific Inc., USA, 2006) számítógépes szoftver segítségével az alábbi kinetikai paramétereket határoztuk meg:

Intravénás beadás esetén:

- $\alpha$  = megoszlási sebességi állandó (megoszlási fázis)
- $t_{1/2 \alpha}$  = megoszlási felezési idő
- $\beta$  = eliminációs sebességi állandó (kiürülési fázis)
- $t_{1/2 \beta}$  = eliminációs felezési idő
- $V_d$  = látszólagos megoszlási térfogat
- $V_c$  = a központi kompartment térfogata
- $V_{d(ss)}$  = a steady state koncentrációnál számított megoszlási térfogat
- $Cl_B$  = teljes test clearance
- MRT = mean residence time= a szervezetben való tartózkodás átlagos ideje
- $AUC_{0-\infty}$  = area under the curve=vagyis a plazmakoncentráció-idő görbe alatti terület

Per os beadás esetén:

- $K_{ab}$  = felszívódási sebességi állandó
- $t_{1/2 ab}$  = felszívódási felezési idő
- $\beta$  = eliminációs sebességi állandó
- $t_{1/2 \beta}$  = eliminációs felezési idő
- $C_{max}$  = maximális plazmakoncentráció
- $t_{max}$  = a  $C_{max}$  eléréséhez szükséges idő
- $V_d$  = virtuális megoszlási térfogat
- $Cl_B$  = teljes test clearance
- $AUC_{0-\infty}$  = area under the curve
- MRT = mean residence time
- F = abszolút biológiai hasznosulás



A kétrekeszes modellnek megfelelően a pillanatnyi plazmakoncentrációkat a következő egyenletek alapján számítottuk ki:

$$\text{Intravénás beadás esetén: } C_p = A \times e^{-\alpha \times t} + B \times e^{-\beta \times t},$$

ahol  $C_p$  az aktuális plazmakoncentráció ( $\mu\text{g/ml}$ ),  $t$  az idő (h),  $A$  és  $B$  azok az extrapolált értékek, ahol a megoszlási és eliminációs görbékhez illesztett egyenesek az  $y$  tengelyt metszik,  $\alpha$  és  $\beta$  pedig a megoszlási és eliminációs sebességi állandók ( $\text{h}^{-1}$ ).

$$\text{Per os beadás esetén: } C_p = e^{-K_{ab} \times t} - B \times e^{-\beta \times t},$$

ahol  $C_p$  az aktuális plazmakoncentráció ( $\mu\text{g/ml}$ ),  $t$  az idő (perc),  $K_{ab}$  a felszívódási sebességi állandó ( $\text{h}^{-1}$ ),  $B$  az az extrapolált érték, ahol a diszpozíciós görbéhez illesztett egyenes az  $y$  tengelyt metszi,  $\beta$  az eliminációs sebességi állandó ( $\text{h}^{-1}$ ).

A megoszlási, eliminációs, illetve a felszívódási felezési időt az alábbi képletek alapján számítottuk ki:

$$t_{1/2 \alpha} = \ln 2 / \alpha = 0,693 / \alpha$$

$$t_{1/2 \beta} = \ln 2 / \beta = 0,693 / \beta$$

$$t_{1/2 ab} = \ln 2 / K_{ab} = 0,693 / K_{ab}$$

Az abszolút per os biológiai hasznosulást az alábbi képlet alapján számítottuk ki:

$$F = (\text{AUC}_{\text{po}} / \text{AUC}_{\text{iv}}) \times (\text{D}_{\text{iv}} / \text{D}_{\text{po}}),$$

ahol  $F$  a biológiai hasznosulás,  $\text{AUC}$  a görbe alatti terület nagysága ( $\text{mg/l} \times \text{h}$ ),  $D$  a dózis ( $\text{mg/kg}$ ). Esetünkben dóziskorrektúra nem volt szükség, mert mindkét beadási mód esetében ugyanazt a dózist alkalmaztuk, vagyis:  $F = \text{AUC}_{\text{po}} / \text{AUC}_{\text{iv}}$

### 3.2.2. A pulykákön végzett farmakokinetikai vizsgálat

**A kísérlet leírása:** Az amoxicillin-klavulánsav kombináció farmakokinetikáját pulykában szintén kétfázisú, kéthetes cross-over vizsgálatban elemeztük. A kezelések, a dózisok és vérvételek a csirkéknél leírtakkal teljesen megegyeztek. A vérvételeket követően szintén RP-HPLC módszerrel, UV-detektálással határoztuk meg a hatóanyagok plazmabeli koncentrációját, majd farmakokinetikai programmal elemeztük eredményeinket.

**A kísérleti állatok:** A kísérletbe 12, BUT-big-6 hibrid fajtájú, konvencionális, vakcinázott, 7 hetes nőstény pulykát vontunk be. Az állatokat gyógyszermentes táppal etettük, ivóvizet ad libitum kaptak. Az állatok a *Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Állatgyógyászati Termékek Igazgatóságának* GLP-minősítésű állatházában kerültek elhelyezésre. A pulykákat a kísérletet megelőzően 12 órán át koplaltattuk. A randomizálás során két, egyenként 6-6 pulykát tartalmazó

csoportot alakítottunk ki. A randomizálást az állatok testtömegét alapul véve, a RANDOM nevű számítógépes szoftver segítségével végeztük. A csoportok közti hasonlóságot Student-féle t-próbával ellenőriztük. Az állatkísérleteket a SZIE-ÁOTK Állatvédelmi Bizottsága engedélyezte.

## A kísérlet menete

### a. Az állatok kezelése

A kezelés menete és körülményei megegyeztek a brojlercsirkéken végzett kísérletben leírtakkal. A *per os* csoport 6 állatának kezelése *Augmentin oralis szuszpenzióval* történt, az alkalmazott dózis a kombinációra 12,5 mg/ttkg (10 mg/ttkg amoxicillin-trihidrát + 2,5 mg/ttkg kálium-klavulanát) volt. A kiszámolt mennyiséget nyelőcsőszondával adtuk be az állatoknak. Az *intravénás* csoport tagjait *Augmentin intravénás injekcióval* kezeltük, melyben a kombináció adagja szintén 12,5 mg/ttkg (10 mg/ttkg amoxicillin-nátrium + 2,5 mg/ttkg kálium-klavulanát) volt. A gyógyszer desztillált vízben való feloldása után a kiszámolt mennyiséget a jobb oldali *v. brachialis* keresztül adtuk be az állatoknak, majd a kéthetes periódus elteltével, a második fázis során a két csoportot felcseréltük. A kísérlet ideje alatt a pulykák esetében sem észleltünk semmiféle kóros klinikai tünetet, sem pedig csökkent étvágyat, illetve vízfogyasztást.

### b. Vérvételek

Mindkét csoport minden tagjából, zárt vérvételi módszerrel heparinózott csövekbe 2 ml vért vettünk a bal oldali *v. brachialisból* a gyógyszerbeadás előtt (0. perc) és azt követően az alábbi időpontokban: 5., 10., 20., 30., 45., 60., 90., 120., 150. perc, valamint 3., 4., 5., 6., 7. és 8. óra.

### c. Centrifugálás, tárolás

A vérvételt követően a vérmintákat 2000/p fordulatszámon 10 percig centrifugáltuk, majd a plazmamintákat -80 °C-ra hűtöttük és ezen a hőmérsékleten tároltuk az RP-HPLC-mérésig.

### d. Mintaelőkészítés és HPLC-mérés

A minták metanollal való fehérjementesítését követően az amoxicillin és a klavulánsav plazmabeli koncentrációját a brojlercsirkéknél leírtak alapján szintén RP-HPLC módszerrel határoztuk meg Hoizey és mtsai (2002) módszere alapján. A mozgófázis szintén 5 v/v% metanolt és 95 v/v%, 0,01M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-ot tartalmazott, kémhatását foszforsav segítségével állítottuk be pH 7,0-ra. A két hatóanyag koncentrációját egymással párhuzamosan, egy mérés során határoztuk meg. Az injektálási térfogat 50 µl, az áramlási sebesség 1,0 ml/perc volt. A törzsoldatokat a brojlercsirkéknél leírtak alapján készítettük, melyek segítségével készítettük el a későbbi mérésekhez használt hétpontos kalibrációs görbéket.

## A módszer validálása

### Specifikusság

Pulykára kidolgozott módszerünkénél is kimondható, hogy nem volt interferencia a mátrixszal, és a kontroll mintánál a kapott jel < kimutathatósági határérték (LOD).

### Linearitás

Pulykára validált módszerünk esetén a lineáris regressziós analízis eredményei szerint az amoxicillin esetén a korrelációs koefficiens értéke 0,99991 volt, klavulánsav esetében 0,99984, mely szerint a módszer az adott koncentráció-tartományban lineárisnak bizonyult ( $r \geq 0,999$ ).

### Visszanyerés (recovery)

Módszerünkre jellemző visszanyerési eredményeink a Függelék 3. és 4. táblázatában láthatók, melyekből kiolvasható, hogy a visszanyerés-értékek (%) minden esetben 95% és 105% között voltak.

### Ismételhetőség és pontosság

A módszer ismételhetőségére és pontosságára vonatkozó adataink a Függelék 3. és 4. táblázatában olvashatók. A fenti adatokból következik, hogy az általunk kapott variációs koefficiens (CV) és pontosság értékek kielégítik a kívánt követelményeket (<10%).

### Kimutathatósági és meghatározási határérték (LOD és LOQ)

A két vegyület LOD és LOQ értékei a 11. táblázatban olvashatók.

#### 11. táblázat : LOD és LOQ értékek: amoxicillin

	LOD( $\mu\text{g/ml}$ )	LOQ( $\mu\text{g/ml}$ )
Amoxicillin	0,04	0,13
Klavulánsav	0,03	0,08

### Stabilitás

A stabilitási vizsgálatokhoz 20  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációban amoxicillint és 20  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációban klavulánsavat tartalmazó modell plazmamintát készítettünk, melyet  $-80^{\circ}\text{C}$ -on 2 hónapig tároltunk. Méréseink alapján ezen a hőmérsékleten amoxicillin esetében -0,44%, klavulánsav esetében -1,32% hatóanyag-csökkenést tapasztaltunk.

#### e. Farmakokinetikai paraméterek meghatározása

Irodalmi adatok alapján, valamint az Akaike és Schwarz (Akaike 1974, Schwarz 1978) kritériumok figyelembevételével az amoxicillin és a klavulánsav kinetikai viselkedésének

jellemzésére pulykában is a kétrekeszes nyitott modellt találtuk megfelelőnek. A farmakokinetikai paraméterek elemzéséhez a Kinetica<sup>®</sup> 4.4 (Thermo Scientific Inc., USA, 2006) számítógépes szoftvert vettük igénybe. Az intravénás és per os alkalmazást követően meghatározásra kerülő paraméterek megegyeztek a 3.2.1.e. pontban leírtakkal.

Az amoxicillin és a klavulánsav biológiai hasznosulását és fontosabb farmakokinetikai paramétereit párosított Student-féle t-próbával, míg a két állatfaj kinetikai paramétereit kétmintás egyenlő varianciájú t-próbával hasonlítottuk össze, jelentős különbségeket keresve.

### 3.3. EREDMÉNYEK

#### 3.3.1. A brojlersirkéken végzett farmakokinetikai vizsgálat

Brojlersirkéken végzett kinetikai vizsgálatunkban az amoxicillin-klavulánsav intravénás beadását követően mindkét hatóanyag viselkedése a plazmában kétrekeszes nyitott modellel volt leírható a legalacsonyabb Akaike és Schwarz kritériumoknak megfelelően. A plazmakoncentrációk változását az idő függvényében az alábbi egyenletek írták le:

$$C_p = 46,58 \times e^{-6,37t} + 2,98 \times e^{-0,54t} \text{ (amoxicillin)}$$

$$C_p = 12,00 \times e^{-6,48t} + 1,03 \times e^{-0,6t} \text{ (klavulánsav).}$$

A hatóanyagok per os beadását követően az Akaike és Schwarz kritériumok alapján kiválasztott egyrekeszes modellel az alábbi függvény-egyenleteket kaptuk:

$$C_p = e^{-4,57t} - 4,67 \times e^{-0,57t} \text{ (amoxicillin)}$$

$$C_p = e^{-4,4t} - 1,43 \times e^{-0,61t} \text{ (klavulánsav)}$$

Az amoxicillin és a klavulánsav mért plazmakoncentráció-értékeit intravénás és szájon át való beadást követően brojlersirkében a Függelék 9.-12. táblázata tartalmazza. A fontosabb farmakokinetikai paramétereket az amoxicillin és klavulánsav esetében 12. és 13. táblázat foglalja össze.

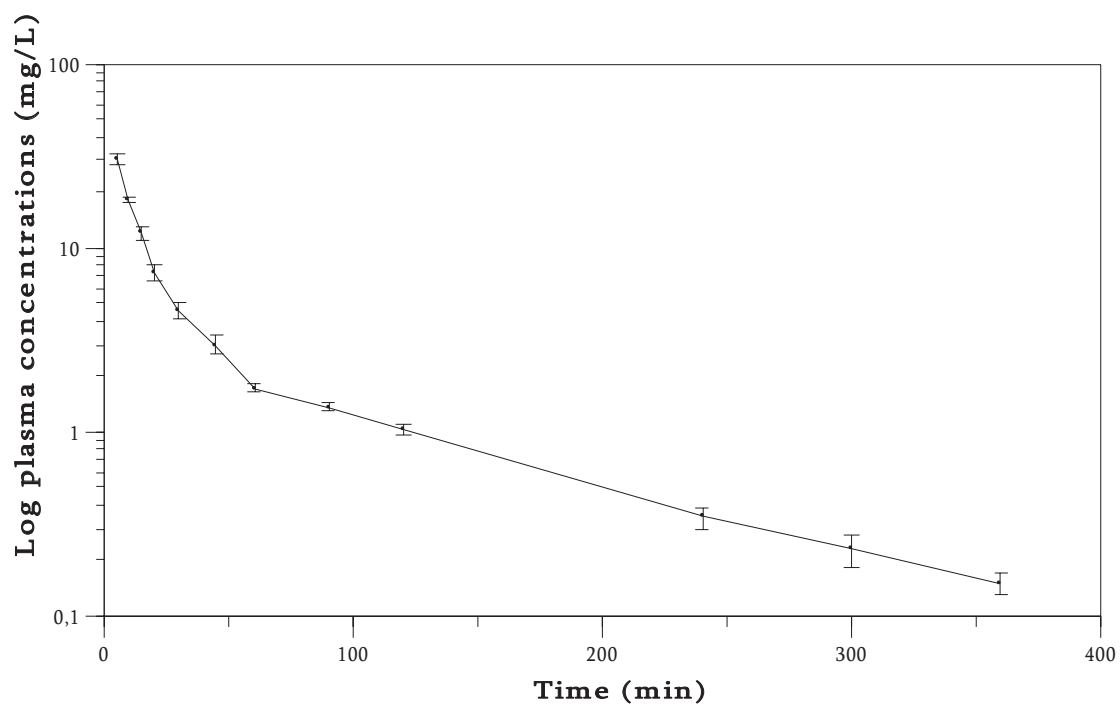
12. táblázat: Az amoxicillin farmakokinetikai paramétereit egyszeri iv. és po. adagolást követően, brojlercsirkében (n=12). 12,5 mg/kg dózis (10 mg/kg amoxicillin és 2,5 mg/kg klavulánsav) beadását követően (átlag ± SD).

paraméter	mértékegység	amoxicillin	
		intravénás	per os
$\alpha$	h <sup>-1</sup>	6,37±0,66	-
$t_{1/2 \alpha}$	h	0,11±0,01	-
$\beta$	h <sup>-1</sup>	0,54±0,02	0,57±0,03
$t_{1/2 \beta}$	h	1,28±0,05	1,21±0,07
$K_{ab}$	h <sup>-1</sup>	-	4,57±0,44
$t_{1/2 ab}$	h	-	0,15±0,01
$C_0$	µg/ml	49,56±6,1	-
$C_{max}$	µg/ml	-	3,46±0,11
$t_{max}$	h	-	0,52±0,02
$V_d$	l/kg	1,44±0,06	2,14±0,11
$V_{d(ss)}$	l/kg	0,98±0,07	-
$V_c$	l/kg	0,21±0,03	-
$Cl_B$	(l/h)/kg	0,78±0,03	1,12±0,06
$AUC_{0-\infty}$	(mg x h)/l	12,81±0,55	8,16±0,38
$MRT$	h	0,88±0,03	1,75±0,11
$F$	%	-	<b>63,8±2,6</b>

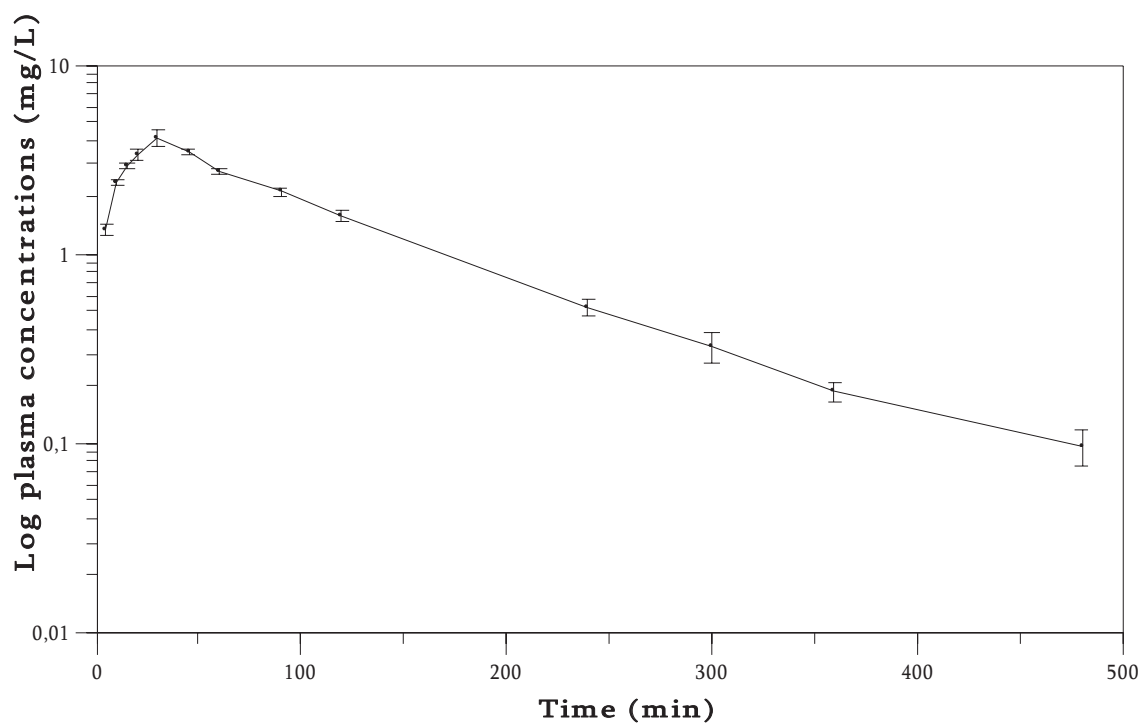
13. táblázat: A klavulánsav formában farmakokinetikai paramétereit brojlercsirkében egyszeri iv. és po. adagolást követően (n=12), 12,5 mg/kg dózis (10 mg/kg amoxicillin és 2,5 mg/kg klavulánsav) beadását követően (átlag  $\pm$  SD).

paraméter	mértékegység	klavulánsav	
		intravénás	per os
$\alpha$	$h^{-1}$	6,48 $\pm$ 0,45	-
$t_{1/2 \alpha}$	h	0,10 $\pm$ 0,01	-
$\beta$	$h^{-1}$	0,60 $\pm$ 0,02	0,62 $\pm$ 0,03
$t_{1/2 \beta}$	h	1,15 $\pm$ 0,06	1,13 $\pm$ 0,06
$K_{ab}$	$h^{-1}$	-	4,41 $\pm$ 0,42
$t_{1/2 ab}$	h	-	0,16 $\pm$ 0,01
$C_0$	$\mu g/ml$	13,0 $\pm$ 1,75	-
$C_{max}$	$\mu g/ml$	-	1,08 $\pm$ 0,05
$t_{max}$	h	-	0,52 $\pm$ 0,04
$V_d$	l/kg	1,17 $\pm$ 0,08	1,74 $\pm$ 0,1
$V_{d(ss)}$	l/kg	0,98 $\pm$ 0,07	-
$V_c$	l/kg	0,20 $\pm$ 0,02	-
$Cl_B$	(l/h)/kg	0,71 $\pm$ 0,04	1,07 $\pm$ 0,03
$AUC_{0-\infty}$	(mg x h)/l	3,55 $\pm$ 0,19	2,33 $\pm$ 0,05
<b>MRT</b>	h	0,78 $\pm$ 0,07	1,62 $\pm$ 0,08
<b>F</b>	%	-	<b>65,7<math>\pm</math>3,1</b>

A két hatóanyag plazmakoncentrációjának változását az idő függvényében intravénás és szájon át való beadást követően a 5-8. ábra szemlélteti.

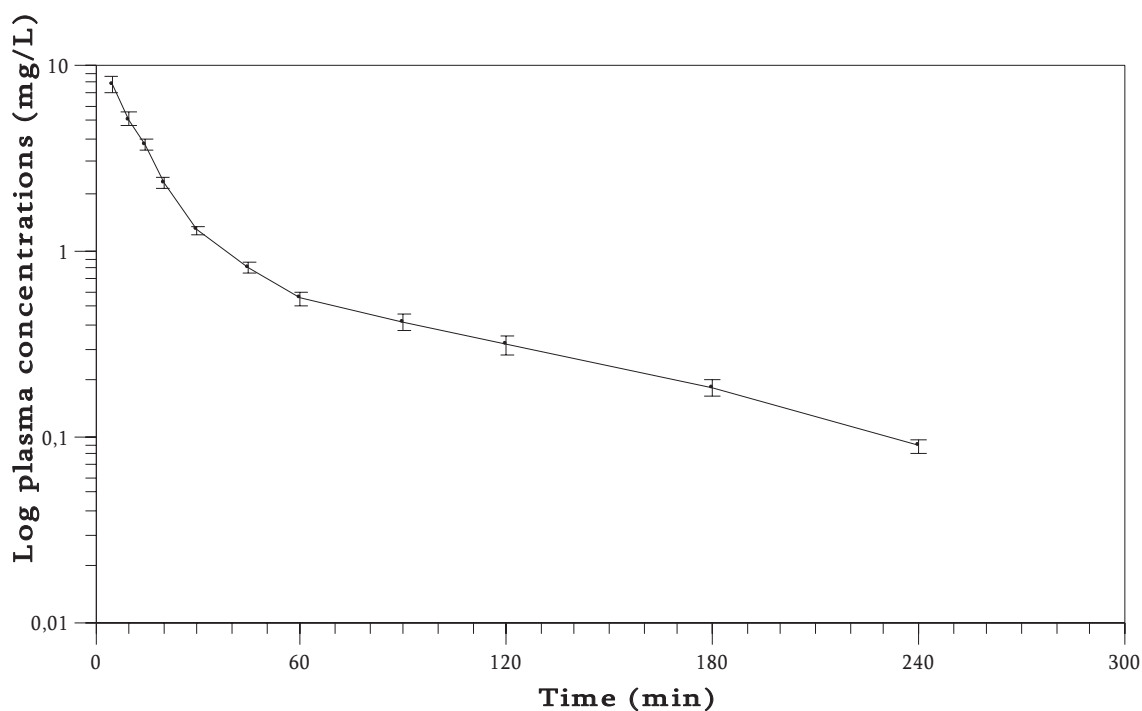


5. ábra: Az amoxicillin plazmakoncentrációjának változása az idő függvényében brojlercsirkében (n=12) egyszeri intravénás alkalmazás után (10 mg/ttkg amoxicillin és 2,5 mg/ttkg klavulánsav kombináció)

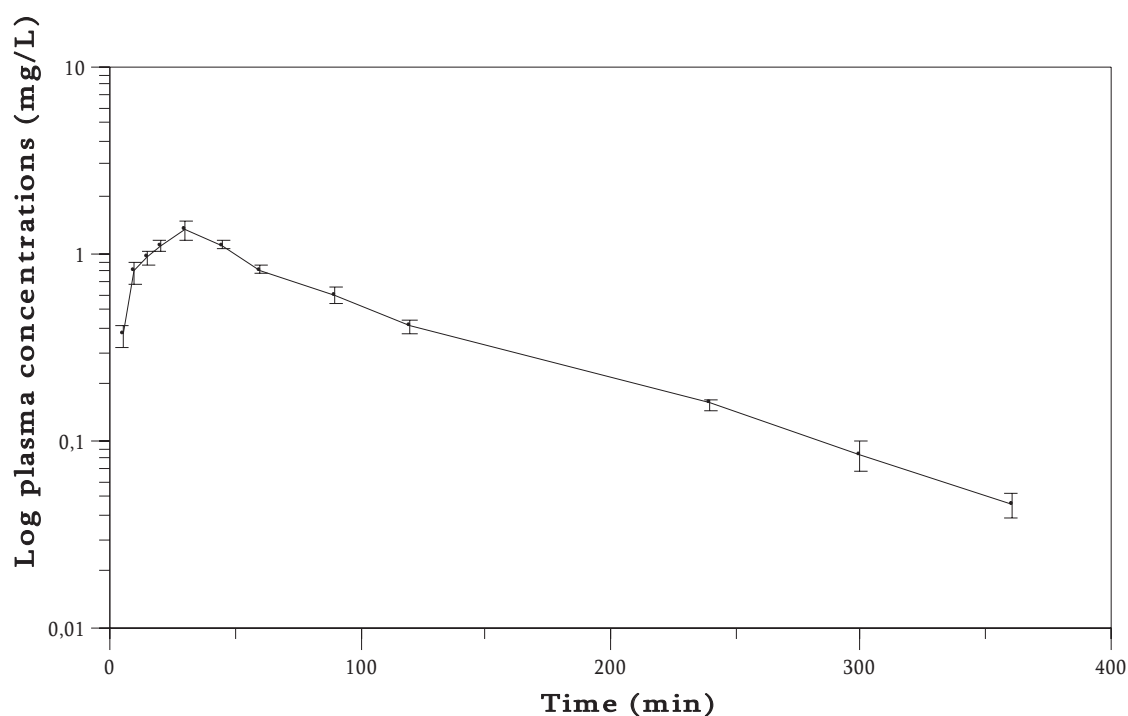


6. ábra: Az amoxicillin plazmakoncentrációjának változása az idő függvényében brojlercsirkében (n=12) egyszeri szájon át történő alkalmazás után (10 mg/ttkg amoxicillin és 2,5 mg/ttkg klavulánsav kombináció)





7. ábra: A klavulánsav plazmakoncentrációjának változása az idő függvényében brojlercsirkében (n=12) egyszeri intravénás alkalmazás után (10 mg/ttkg amoxicillin és 2,5 mg/ttkg klavulánsav kombináció)



8. ábra: A klavulánsav plazmakoncentrációjának változása az idő függvényében brojlercsirkében (n=12) egyszeri szájon át történő alkalmazás után (10 mg/ttkg amoxicillin és 2,5 mg/ttkg klavulánsav kombináció)

A vizsgálathoz kidolgozott RP-HPLC módszerünk brojlercsirkében teljesítette a farmakokinetikailag megkívánt követelményeket: mind amoxicillin, mind klavulánsav esetében képesek voltunk  $1/10 C_{\max}$ -nak megfelelő koncentráció-értékeket mérni,  $3 t_{1/2\beta}$  mérési időintervallumban. Az  $AUC_{\text{rest}}$  értéke minden esetben kisebb volt, mint 20%.

### 3.3.2. A pulykákön végzett farmakokinetikai vizsgálat

Pulykában az Akaike és Schwarz kritériumoknak leginkább megfelelő modellnek szintén a kétrekeszes nyitott modell adódott. Az amoxicillin és klavulánsav plazmakoncentrációjának változását leíró egyenesek intravénás beadás esetén így a következő egyenletekkel definiálhatók:

$$C_p = 45,88 \times e^{-6,38t} + 3,00 \times e^{-0,54t} \text{ (amoxicillin)}$$

$$C_p = 12,27 \times e^{-6,05t} + 1,22 \times e^{-0,59t} \text{ (klavulánsav)}$$

Per os beadás esetén a csirkéknél végzett számításokhoz hasonlóan szintén az egyrekeszes nyitott modellt alkalmaztuk, és az alábbi egyenleteket kaptuk:

$$C_p = e^{-5,36t} - 4,15 \times e^{-0,54t} \text{ (amoxicillin)}$$

$$C_p = e^{-5,34t} - 1,37 \times e^{-0,55t} \text{ (klavulánsav)}$$

A további, Kinetica<sup>®</sup> 4.4 számítógépes szoftver segítségével meghatározott, amoxicillinre és klavulánsavra vonatkozó legfontosabb farmakokinetikai paraméterek a 14. és 15. táblázatban találhatóak. Az amoxicillin és a klavulánsav mért plazmakoncentráció-értékeit intravénás és szájon át való beadást követően pulykában a Függelék 13-16. táblázata tartalmazza.

14. táblázat: Az amoxicillin farmakokinetikai paraméterei egyszeri iv. és po. adagolást követően, pulykában (n=12). 12,5 mg/kg dózis (10 mg/kg amoxicillin és 2,5 mg/kg klavulánsav) beadását követően (átlag ± szórás).

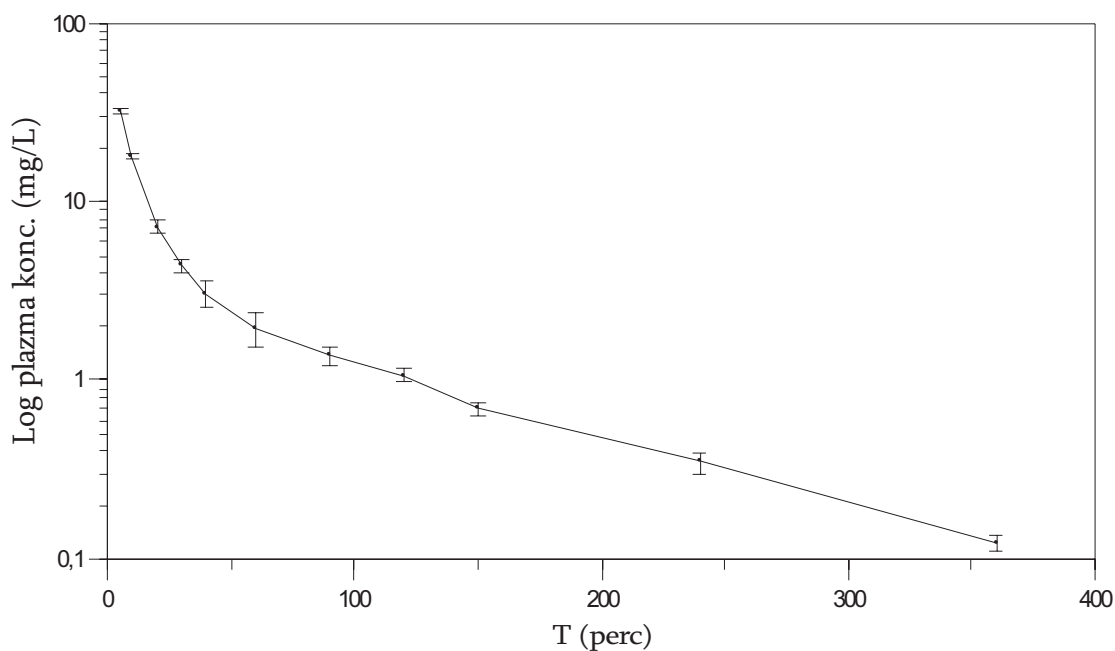
paraméter	mértékegység	amoxicillin	
		intravénás	per os
$\alpha$	$h^{-1}$	6,38±0,69	-
$t_{1/2 \alpha}$	h	0,11±0,01	-
$\beta$	$h^{-1}$	0,54±0,01	0,54±0,02
$t_{1/2 \beta}$	h	1,28±0,03	1,28±0,05
$K_{ab}$	$h^{-1}$	-	5,36±0,22
$t_{1/2 ab}$	h	-	0,13±0,01
$C_0$	$\mu g/ml$	48,9±5,7	-
$C_{max}$	$\mu g/ml$	-	3,20±0,12
$t_{max}$	h	-	0,48±0,01
$V_c$	l/kg	0,21±0,02	-
$V_{d(ss)}$	l/kg	0,70±0,03	-
$V_d$	l/kg	1,45±0,03	2,42±0,12
$Cl_B$	(l/h)/kg	0,78±0,02	1,31±0,05
$AUC_{0-\infty}$	(mg x h)/l	12,72±0,28	7,66±0,30
MRT	h	0,89±0,05	1,85±0,07
F	%	-	<b>60,2±2,6</b>

15. táblázat: : A klavulánsav farmakokinetikai paramétereit egyzeri iv. és po. adagolást követően, pulykában, 12,5 mg/kg dózis (10 mg/kg amoxicillin és 2,5 mg/kg klavulánsav) beadását követően (átlag ± szórás).

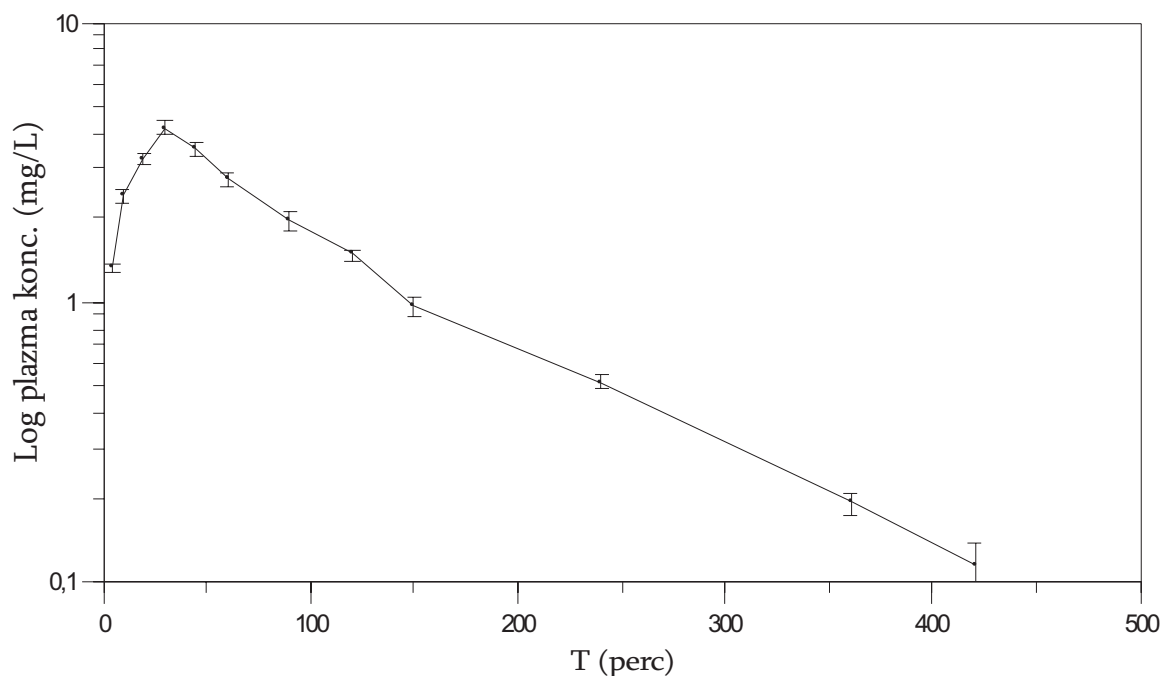
paraméter	mértékegység	klavulánsav	
		intravénás	per os
$\alpha$	$h^{-1}$	6,05±0,96	-
$t_{1/2 \alpha}$	h	0,12±0,02	-
$\beta$	$h^{-1}$	0,59±0,05	0,55±0,03
$t_{1/2 \beta}$	h	1,18±0,12	1,27±0,07
$K_{ab}$	$h^{-1}$	-	5,34±0,35
$t_{1/2 ab}$	h	-	0,13±0,01
$C_0$	$\mu g/ml$	13,5±1,47	-
$C_{max}$	$\mu g/ml$	-	1,05±0,12
$t_{max}$	h	-	0,48±0,02
$V_c$	l/kg	0,18±0,02	-
$V_{d(ss)}$	l/kg	0,57±0,03	-
$V_d$	l/kg	1,04±0,08	1,85±0,20
$Cl_B$	(l / h)/kg	0,61±0,03	1,01±0,10
$AUC_{0-\infty}$	(mg x h)/l	4,11±0,28	2,49±0,23
$MRT$	h	0,92± 0,05	1,82±0,10
$F$	%	-	<b>60,7±6,3</b>

A pulykán végzett vizsgálathoz kidolgozott RP-HPLC módszerünk szintén teljesítette a farmakokinetikailag megkívánt követelményeket: mind amoxicillin, mind klavulánsav esetében képesek voltunk 1/10  $C_{max}$ -nak megfelelő koncentráció-értékeket mérni, 3  $t_{1/2\beta}$  mérési időintervallumban. Az  $AUC_{rest}$  értéke itt is minden esetben kisebb volt, mint 20%.

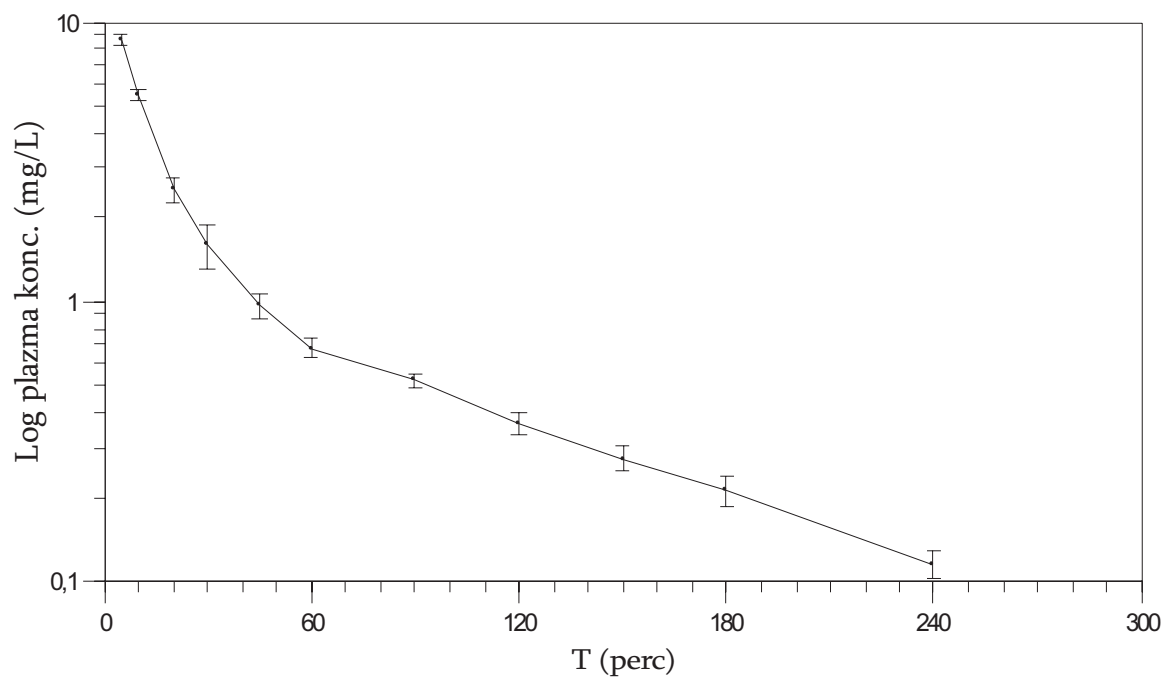
A két hatóanyag plazmakoncentrációjának változását az idő függvényében intravénás és szájon át való beadást követően a 9-12. ábra szemlélteti.



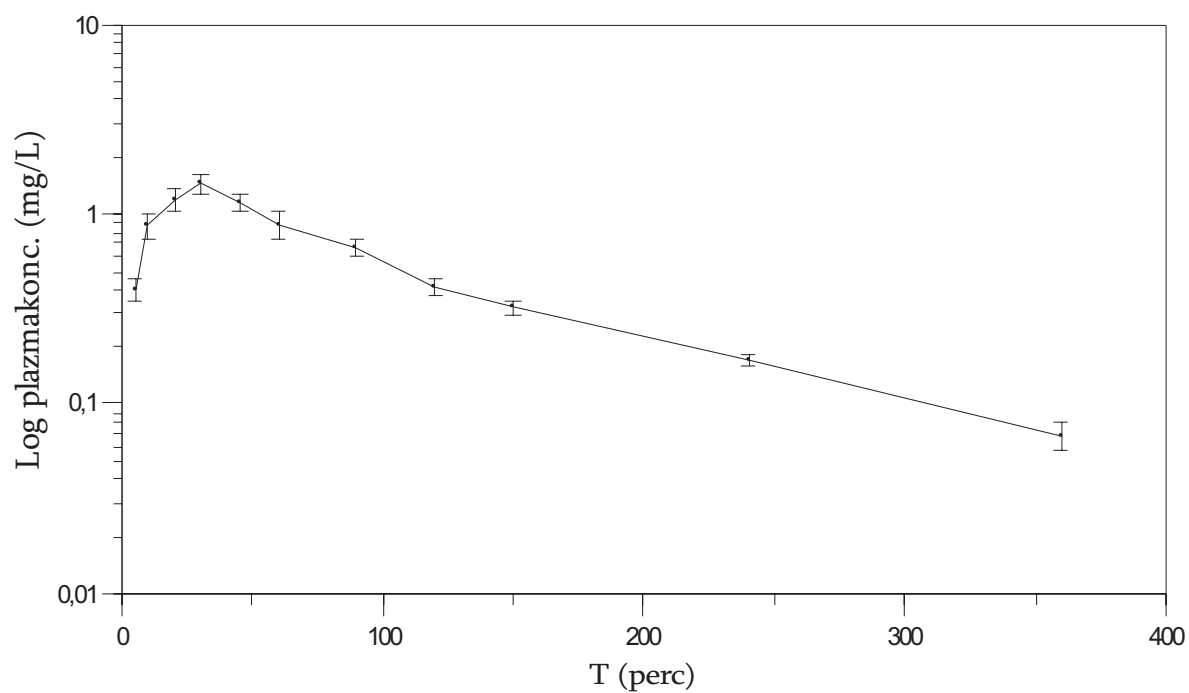
9. ábra: Az amoxicillin plazmakoncentrációjának változása az idő függvényében pulykában (n=12) egyszeri intravénás alkalmazás után (10 mg/ttkg amoxicillin és 2,5 mg/ttkg klavulánsav kombináció)



10. ábra: Az amoxicillin plazmakoncentrációjának változása az idő függvényében pulykában (n=12) egyszeri per os alkalmazás után (10 mg/ttkg amoxicillin és 2,5 mg/ttkg klavulánsav) kombináció



11. ábra: A klavulánsav plazmakoncentrációjának változása az idő függvényében pulykában (n=12) egyszeri intravénás alkalmazás után (10 mg/ttkg amoxicillin és 2,5 mg/ttkg klavulánsav kombináció)



12. ábra: A klavulánsav plazmakoncentrációjának változása az idő függvényében pulykában (n=12) egyszeri per os alkalmazás után (10 mg/ttkg amoxicillin és 2,5 mg/ttkg klavulánsav kombináció)

### 3.4. MEGBESZÉLÉS

#### 3.4.1. A brojlersirkéken végzett farmakokinetikai vizsgálat

Egy antibakteriális anyag *in vivo* hatékonyságát nagymértékben képes befolyásolni az a tulajdonsága, hogy hogyan képes a hatóanyag a fertőzés helyére eljutni. Ha az antibiotikumot egy másik molekulával kombinációban alkalmazzuk, nagy előny, ha farmakokinetikai tulajdonságaik hasonlóak, így biztosítva a szinergizmus jó hatásfokát. Igen lényeges tehát, hogy a  $\beta$ -laktamázgátló klavulánsav hasonlóképp viselkedjen a szervezetben, mint az antibakteriális hatású amoxicillin.

A Kinetica<sup>®</sup> 4.4 számítógépes szoftver segítségével meghatározott, amoxicillinre és klavulánsavra vonatkozó legfontosabb farmakokinetikai paraméterek brojlersirkében a 12. és 13. táblázatban található. Az Akaike és Schwarz kritériumok figyelembevételével megállapítottuk, hogy brojlersirkében az amoxicillin-klavulánsav kombináció intravénás alkalmazása után a kétrekeszes-nyitott farmakokinetikai modellel írhatjuk le mindkét molekula megoszlását a szervezetben, míg *per os* adagolás után az egyrekeszes-nyitott modellt találtuk a legalkalmasabbnak a paraméterek leírására. Ez a megfigyelésünk összhangban áll az irodalmi adatokkal (El-Sooud és mtsai 2004; Carceles és mtsai 1995).

A vizsgálataink során kapott farmakokinetikai paramétereket elemezve elmondható, hogy mindkét hatóanyag gyors megoszlást és lassabb eliminációt mutat **intravénás** applikációt követően, a megoszlási felezési idő amoxicillin esetében  $0,11 \pm 0,01$  h és klavulánsav esetében  $0,10 \pm 0,01$  h, az eliminációs felezési idő rendre  $1,28 \pm 0,05$  h, és  $1,15 \pm 0,06$  h. Ez utóbbi statisztikailag szignifikáns eltérésnek tekinthető a két hatóanyag között ( $p < 0,05$ ). A clearance értékek  $0,78 \pm 0,03$  l/h/kg és  $0,71$  l/h/kg, az MRT  $0,88 \pm 0,03$  h és  $0,78 \pm 0,07$  h amoxicillin és klavulánsav esetében. Mindkét érték szignifikáns különbséget mutat ( $p < 0,05$ ) a két hatóanyag között, az amoxicillin esetében magasabb értékekkel. Amoxicillinnél a terület módszerrel számolt virtuális megoszlási térfogat szignifikánsan nagyobb volt ( $p < 0,01$ ) a klavulánsavnál, amely arra utal, hogy az aminopenicillin a laktamáz-inhibítornál jobban penetrál a szövetekbe, s vélhetően ezzel függ össze az előbbi hosszabb eliminációs felezési ideje.

**Per os** applikációt követően a felszívódási felezési idő  $0,15 \pm 0,01$  h és  $0,16 \pm 0,01$  h volt amoxicillin és klavulánsav esetében, a felszívódás sebességében tehát nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget ( $p > 0,05$ ). A maximális plazmakoncentrációnál a két hatóanyag aránya megfelelt a kombináció hatékony arányának ( $\sim 3,2:1$ ). Nem volt szignifikáns különbség a hatóanyagok maximális plazmakoncentrációjának eléréséhez szükséges időben ( $t_{max}$ ). A szájon át való biológiai hasznosulás amoxicillinnél  $63,8 \pm 2,6\%$ , klavulánsavnál  $65,7 \pm 3,1\%$  volt, amely szintén nem mutatott jelentős eltérést ( $p > 0,05$ ).

A két hatóanyag szervezetben való viselkedését elemezve tehát megállapíthatjuk, hogy az amoxicillinre jobb szöveti penetráció, szignifikánsan magasabb virtuális eloszlási térfogat jellemző, mellyel összefüggésben a szervezetből lassabban eliminálódik. Mindezek következtében hosszabb eliminációs felezési idő és szervezetben való tartózkodási idő (MRT) jellemzi a hatóanyagot. A klavulánsav kevésbé penetrál a szövetek közé, virtuális eloszlási térfogata alacsonyabb, így eliminációs felezési ideje és szervezetben való tartózkodási ideje (MRT) rövidebb. Szájon át való alkalmazást követően nem találtunk lényeges eltérést a két hatóanyag kinetikai paramétere között. A fent említett különbségek ugyan matematikailag szignifikánsnak tekinthetők, azonban biológiailag gyakorlatilag nem jelentősek. Kijelenthetjük tehát, hogy a két hatóanyag kombinációja farmakokinetikai szempontból brojlerszékében megfelelő hatékonysággal alkalmazható érzékeny baktériumok okozta fertőzések esetén. Kísérleteinkben kapott eredményeink összhangban álltak egyes szerzők korábbi vizsgálataival (El-Sooud és mtsai 2004, Carceles és mtsai 1995). Mind saját eredményeink, mind a fenti szerzők adatai az amoxicillin kinetikájának tekintetében azonban jelentősen eltérnek Anadón és mtsai (1996) eredményeitől, gyakorlatilag az összes klinikailag fontos paraméterben ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$ , felezési idők, megoszlási térfogat, MRT, AUC). Meghatároztuk továbbá a szakirodalomban elsőként a klavulánsav per os biológiai hasznosulását brojlerszékében, amely az amoxicillinéhez igen hasonló ( $p > 0,05$ ), így hozzájárul a hatóanyagok medikált ivóvízben való együttes, hatékony alkalmazásához.

### 3.4.2. Pulykákön végzett farmakokinetikai vizsgálat

A Kinetica<sup>®</sup> 4.4 számítógépes szoftver segítségével meghatározott, amoxicillinre és klavulánsavra vonatkozó legfontosabb farmakokinetikai paraméterek a 14. és 15. táblázatban találhatóak. Pulykában végzett vizsgálataink esetében is az Akaike és a Schwarz kritériumok figyelembe vételével állapítottuk meg a megfelelően illeszkedő farmakokinetikai modellt, amely intravénás beadás esetén kétrekeszes, per os beadást követően egyrekeszes nyitott modellt jelent.

**Intravénás** beadás esetén a kombináció mindkét komponensét tekintve gyors megoszlási és annál lassabb eliminációs fázist tapasztaltunk. Az amoxicillin és a klavulánsav megoszlási felezési ideje  $0,11 \pm 0,01$  h, illetve  $0,12 \pm 0,02$  h, amely nem mutat szignifikáns eltérést a két hatóanyag ezen paramétere között ( $p > 0,05$ ). Eliminációs felezési idejük  $1,28 \pm 0,03$  h, illetve  $1,18 \pm 0,12$  h amoxicillinnél és klavulánsavnál, amely szignifikáns eltérésnek minősül ( $p < 0,05$ ), és az aminopenicillin lassabb ürülésére utal. A teljes testre vonatkoztatott clearance érték amoxicillin esetében  $0,78 \pm 0,12$  (l/h)/kg, míg klavulánsavra nézve  $0,61 \pm 0,03$  (l/h)/kg, amely szintén szignifikáns különbség ( $p < 0,05$ ). A MRT-érték, amely a két hatóanyag fenti sorrendjében  $0,89 \pm 0,05$  h-nek és  $0,92 \pm 0,05$  h-nak adódott, nem mutatott jelentős eltérést ( $p > 0,05$ ). A területi módszer alapján számított megoszlási térfogat ( $V_d$ ) a klavulánsav  $1,04 \pm 0,08$  l/kg-os értékéhez képest amoxicillin



esetében szignifikánsan nagyobbak,  $1,45 \pm 0,03$  l/kg-nak adódott ( $p < 0,05$ ). A fenti paraméterek jelzik, hogy az amoxicillin jobban penetrál a szövetekbe és magyarázzák az aminopenicillin elhúzódóbb eliminációját a laktamáz-inhibitorhoz képest, annak ellenére, hogy az amoxicillin vérből való eliminációja kissé gyorsabb.

**Per os** beadás esetén a két hatóanyag felszívódási felezési ideje gyakorlatilag megegyezett ( $0,13 \pm 0,01$  h). Amoxicillin esetében  $1,28 \pm 0,05$  h, klavulánsavnál pedig  $1,27 \pm 0,07$  h eliminációs felezési időt tapasztaltunk, amely nem mutat szignifikáns eltérést ( $p > 0,05$ ). A maximális plazmakoncentráció a hatóanyagok fenti sorrendjében  $3,20 \pm 0,12$   $\mu\text{g/ml}$ -nek, illetve  $1,05 \pm 0,12$   $\mu\text{g/ml}$ -nek adódott, melynek eléréséhez  $0,48 \pm 0,01$  h, illetve  $0,48 \pm 0,02$  h-ra volt szükség ( $p > 0,05$ ). Az amoxicillin szájon át való biológiai hasznosulása  $60,2 \pm 2,6\%$ -os, míg a klavulánsavé  $60,7 \pm 6,3\%$ -os ( $p > 0,05$ ).

Összefoglalva, intravénás beadás esetén jelentős eltérést tapasztaltunk a két hatóanyag eliminációs felezési idejében, clearance-ében és megoszlási térfogatában ( $p < 0,05$ ), míg MRT-értékükben és megoszlási felezési idejükben nem volt szignifikáns a különbség ( $p > 0,05$ ). A csirkében tapasztaltakhoz hasonlóan az amoxicillin jobb szöveti penetrációjával, nagyobb megoszlási térfogatával hozható összefüggésbe hosszabb eliminációs felezési ideje, mely különbség pulykában az MRT szintjén matematikailag nem mutatkozott. **Per os** beadás esetén nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget sem az amoxicillin és a klavulánsav felszívódási és eliminációs felezési idejében, sem a maximális plazmakoncentráció eléréséhez szükséges időtartamban, sem a biológiai hasznosulás mértékében. A kombinációban szereplő komponensek gyakorlati szempontból fontos farmakokinetikai paraméterei tehát igen hasonlóak, és bár bizonyos paraméterekben matematikailag szignifikáns volt a különbség, biológiailag ezek az eltérések ebben az állatfajban sem számottevőek. Fontos kiemelni továbbá, hogy a szervezetben való tartózkodási idejük (MRT) sem mutatott szignifikáns eltérést. Mindezek alapján elmondható, hogy a két hatóanyag nemcsak hatásmechanizmusát tekintve (laktamáz-gátlás és sejtfalszintézis-gátlás), hanem farmakokinetikai szempontból is kiválóan alkalmas az együttes alkalmazásra.

### **3.4.3. Az amoxicillin-klavulánsav kombináció összehasonlító farmakokinetikája csirkében és pulykában per os és intravénás beadást követően**

Kísérleteink során a két állatfaj farmakokinetikai paramétereit is összehasonlítottuk mindkét hatóanyag és mindkét beadási mód esetében. Az *amoxicillin intravénás* beadását követően nem találtunk szignifikáns eltéréseket ( $p < 0,05$ ) a megoszlási és eliminációs felezési időkben, a hatóanyag eloszlási térfogatában, a teljes test clearance-ben, valamint az AUC és MRT értékekben sem. Vizsgálataink nem erősítették meg Carceles és mtsai (1995) eredményeit, miszerint a

hatóanyag megoszlási és eliminációs felezési ideje hosszabb lenne pulykában, clearance és MRT értékei pedig rövidebbek. Az *amoxicillin szájon át* való beadását követően azonban számos jelentős eltérést tapasztaltunk. A felszívódási felezési idő csirkében hosszabb ( $p < 0,05$ ), az eliminációs felezési idő pedig rövidebb. A maximális plazmakoncentráció csirkében jelentősen magasabb és ebben az állatfajban az ennek eléréséhez tartozó idő hosszabb. A hatóanyag clearance-értéke is alacsonyabb, mint pulykában ( $p < 0,05$ ), az AUC-érték pedig jelentősen magasabb ( $p > 0,05$ ). Mindezek eredőjeként az amoxicillin szájon át való biológiai hasznosulása jobb csirkében ( $F = 63,8 \pm 2,6\%$ ), mint pulykában ( $F = 60,2 \pm 2,6\%$ ). Csirkében kapott eredményeink összhangban állnak El-Sooud és mtsai (2004) eredményeivel, az általunk mért biológiai hasznosulás azonban kissé magasabb az általuk tapasztaltnál. Az Anadón és mtsai (1996) által kapott paraméterek nem állnak összhangban eredményeinkkel. Pulykában az amoxicillin szájon át való alkalmazását követő farmakokinetikai mutatókról a szakirodalomban nem található adat, ezt a hiányt eredményeink pótolják.

A *klavulánsav intravénás* beadását követően szintén jelentős eltéréseket tapasztaltunk a két állatfaj farmakokinetikai paramétereiben. A hatóanyag eloszlási térfogata és clearance értéke szignifikánsan nagyobbak bizonyult csirkében, amely azt jelzi, hogy a laktamázinhibitor jobban penetrál a szövetekbe, a plazmában keringő gyógyszert viszont a szervezet gyorsabban kiválasztja. Ennek következtében a felezési idők lényegében azonosak, nem tapasztalható jelentős eltérés a két faj között e paraméterek tekintetében ( $p > 0,05$ ). Az AUC és MRT értékek szignifikánsan magasabbak voltak pulykában, mint csirkében, és mindezek megerősítik Carceles és mtsai (1995) eredményeit. A *klavulánsav szájon át* való adását követően az eliminációs felezési idő jelentősen hosszabb volt pulykában ( $p < 0,05$ ), a felszívódási felezési idő pedig rövidebb. Az MRT-érték - a fentiekkel összhangban - szintén szignifikánsan magasabb volt pulykában ( $p < 0,05$ ). A klavulánsav szájon át való biológiai hasznosulása – az amoxicillinhez hasonlóan – szignifikánsan nagyobb csirkében ( $F = 65,7 \pm 3,1\%$ ), mint pulykában ( $F = 60,7 \pm 6,3\%$ ).

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a két hatóanyag közötti számos matematikai eltérés mellett biológiailag komoly jelentőséggel bíró különbséget a farmakokinetikai paraméterekben egyik állatfajban sem találtunk. A két állatfaj farmakokinetikáját összehasonlítva a legfontosabb különbség mindkét hatóanyag biológiai hasznosulásában észlelhető: mind az amoxicillin, mind a klavulánsav szájon át való hasznosulása magasabb csirkében, mint pulykában ( $p < 0,05$ ).

## 4. BAROMFIBÓL IZOLÁLT *E. COLI*, *S. ENTERICA* ÉS *P. MULTOCIDA* BAKTÉRIUMTÖRZSEK ÉRZÉKENYSÉGE AZ AMOXICILLIN- KLAVULÁNSAV KOMBINÁCIÓRA

### 4.1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az amoxicillin-klavulánsav kombinációnak vitathatatlanul az egyik legnagyobb előnye széles **antibakteriális spektruma**. A klinikailag is jelentős baktériumok közül a következők érzékenyek az amoxicillin és klavulánsav kombinációjára. Gram-pozitív baktériumok közül a *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Listeria* spp., *Actinomyces* spp., *Corynebacterium* spp. Gram-negatívok közül a *Pasteurella* spp., *Haemophilus* spp., *Mannheimia haemolytica*, *Actinobacillus* spp., *Moraxella* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Bordetella* spp., *Shigella* spp., *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Helicobacter* spp., *Leptospira* spp., *Borrelia burgdorferi*, *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium necrophorum*. Aláhúzással kerültek jelölésre azok a baktériumok, amelyek a klavulánsav nélkül alkalmazott amoxicillinnel szemben gyakorlatilag rezisztensek, a kombinációra azonban érzékenyek. A kombinációnak nincs hatása *Pseudomonas* spp., *Mycoplasma* spp., *Chlamydia* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. baktériumokra és a meticillinrezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) törzsekre.

Egyes baktériumok, mint például az *E. coli*, a *K. pneumoniae* vagy a *P. mirabilis* és a *P. vulgaris* ellen az amoxicillin ugyan hatékony, de ezen kórokozók MIC (minimal inhibitory concentration = minimális gátló koncentráció) értékei a többi baktériuménál nagyobbak, így ezen kórokozók ellen biztos baktericid hatás csak a vizeletben érvényesül, ahol is a gyógyszer nagy koncentrációt ér el.

A penicillinekkal szembeni **rezisztencia** igen gyakori és többféle mechanizmussal jöhet létre.

1. Az egyik fő típus az ún. intrinsic rezisztencia, mely azt jelenti, hogy bizonyos kórokozók *ab ovo* rezisztensek meghatározott antibakteriális hatóanyagokra. Ez a tulajdonság a baktériumok genetikai, strukturális vagy fiziológiai jellemzőiből adódik, az adott baktériumcsoport, genus vagy faj minden egyes tagjára jellemző, ezért kiszámítható, várható. *Ab ovo* penicillin-rezisztens baktériumok többek között a sejtfal nélküli *Mycoplasma* spp., a rendkívül ellenálló sejtfallal rendelkező *Mycobacterium* spp. és a *P. aeruginosa*, amelyek vastag, porinszatornában szegény

sejtfalán az amoxicillin nem képes kellő mértékben áthatolni, következésképpen nem tud a PBP-enzimekhez kötődni (Giguere és mtsai 2006). Ezen kórokozók ellen a kombinációnak nincs hatása.

A rezisztencia-mechanizmusok további típusai az extrinsic (szerzett) rezisztencia körébe tartoznak, melynek hátterében az áll, hogy egy bizonyos idő elteltével - többnyire genetikai alapon - megváltoznak a baktériumsejtek strukturális vagy fiziológiás tulajdonságai; így alakítanak ki másodlagos rezisztenciát a rájuk ható antibiotikumokkal szemben. Ez a típusú rezisztencia általában csak bizonyos törzseket érint, megjelenése kiszámíthatatlan.

2. A szerzett rezisztencia leggyakoribb oka, hogy a baktérium ún.  $\beta$ -laktamáz (*penicillináz*) enzimet termel, amely felnyitja a baktericid hatáshoz nélkülözhetetlen  $\beta$ -laktámgyűrűt. Ilyen enzimet termelnek a *Staphylococcaceae* család képviselői és a Gram-negatívok többsége, így az *Enterobacteriaceae* család tagjai, a *B. fragilis*, tápigényes haemophilusok, pasteurellák és actinobacillusok, campylobacterek, valamint számos más kórokozó. A rezisztens baktériumok szerkezetükben és így spektrumukat illetően is különböző, a  $\beta$ -laktám-típusú antibiotikumot bontó enzimeket termelnek, amelyek termelődése többnyire konstitutív, de lehet induktív is, amikor a baktérium az antibiotikum jelenlétében indítja el rendkívüli intenzitással a laktamáz termelését. Ez utóbbira jellemző példa a *S. aureus* által termelt penicillináz, amely a baktériumon kívül is nagy koncentrációban jelenik meg.

Már 1940-ben, amikor a penicillint még nem is használták a terápiában, *E. coli* baktériumból izoláltak egy penicillint károsító enzimet. Ez a közlés tekinthető a penicillináz első leírásának (Abraham és mtsai 1940). A Gram-negatív baktériumok penicillináz-termelését többnyire átvihető plazmid irányítja, ennek igazolására már a múlt század 60-as éveiben sor került (Datta és mtsai 1965). A Gram-negatív baktériumok  $\beta$ -laktamázainak szerepét és jelentőségét először Richmond és Sykes írta le (1973). Az elmúlt 25 évben számos új  $\beta$ -laktám antibiotikumot fedeztek fel és vettek igénybe a terápiában, ezzel párhuzamosan azonban a  $\beta$ -laktamázok száma is egyre gyarapodott. Jelenleg több mint 400, a széles spektrumú  $\beta$ -laktám antibiotikumok ellen is ható laktamáz ismerünk (Xian-Zhi Li és mtsai 2007). Szerkezetük, eredetük és a különböző  $\beta$ -laktám antibiotikumok elleni hatásuk alapján osztályozzák őket. A nemzetközileg elfogadott ún. Bush-szerinti osztályozást (Bush és mtsai 1995) kiegészítve az újabb, Ambler-féle strukturális osztályozás (Ambler 1980) alapelveivel a 16. táblázatban mutatjuk be. A Bush-féle első csoportba a régóta komoly jelentőségű, staphylococcusok által termelt enzimek, míg a további csoportokba főleg Gram-negatív baktériumok laktamázai tartoznak. A  $\beta$ -laktamázok elleni küzdelemben mérföldkő volt az 1972-ben felfedezett klavulánsav, amely igen hatékony enzimgátló tulajdonsága révén hatástalanítja a  $\beta$ -laktamáz enzimek túlnyomó többségét, áttörve így számos Gram-pozitív és Gram-

negatív baktérium penicillin-rezisztenciáját is. Az amoxicillin-klavulánsav kombináció tehát az amoxicillin egy komoly hátrányát,  $\beta$ -laktamáz-érzékenységét hivatott kivédeni.

16. táblázat: A laktamázok Bush és Ambler szerinti csoportosítása (Giguere és mtsai 2006)

Osztály	Alosztály	Ambler-féle molekuláris besorolás	Leírás	Klavulánsav gátolja
1	-	C	Gram-negatívok kromoszomális enzimeit	-
2	2a	A	Staphylococcusok és enterococcusok által termelt penicillinázok	+
	2b	A	Gram-negatívok TEM és SHV enzimeit (szűkebb spektrum)	+
	2be	A	Gram-negatívok ESBL enzimeit (széles spektrum)	+
	2c	A	Karbenicillinázok	+
	2d	D	Oxacillinázok	±
	2e	A	Cefalosporinázok	+
	2f	A	Karbapenemázok	+
3	-	B	Metallo-laktamázok	-
4	-	?	Egyéb enzimek	-

A fenti laktamázok elsősorban kórházi fekvőbetegekből izolált mintákból kerültek kimutatásra, de az antibiotikum-használat előtérbe kerülésével egyre inkább elterjedtek, és ma már háziállatainkból is rendszeresen izolálásra kerülnek (Xian-Zhi Li és mtsai 2007). Kiemelkedő jelentőséggel bírnak a Bush-féle 1-es csoportba tartozó, C molekuláris osztályba sorolt kromoszomális, illetve plazmidon kódolt enzimek, amelyek a legtöbb  $\beta$ -laktámvázas antibiotikumot, így a penicillineket, az 1., 2. és 3. generációs cefalosporinokat és a monobaktámokat is képesek elbontani. További veszélyük, hogy enziminhibítorral nem hatástalaníthatók, mert a laktamáz-enzimek hiperprodukcója miatt a kompetitív antagonizmus az enzim és az enzimgátló között nem alakulhat ki. Ebbe a csoportba tartoznak az *E. coli* ún. AmpC-típusú kromoszomán és plazmidon kódolt enzimeit (Caroff és mtsai 1999). A kromoszomán helyeződő enzim előfordulása igen ritka, és egy promoter-mutáción alapul, amely így elősegíti az

enzim nagymértékű termelését. Jóval gyakoribb az ehhez hasonló, plazmidon kódolt, ún. AmpC-szerű  $\beta$ -laktamáz termelése, mely leggyakrabban egy CMY-2 nevű enzim, cefamicináz, amely a kifejezett laktamáz-ellenálló cefamicineket (pl. cefoxitin) is képes elbontani. A fentiekben elmondottak alapján ezek az enzimek klavulánsavval nem gátolhatók (Stapleton és mtsai 1995). Ezen plazmidot hordozó baktériumok esetében szinte kivétel nélkül találunk más antibakteriális szer elleni rezisztenciagént is, így nem csupán a legtöbb  $\beta$ -laktámra, hanem aminoglikozidokra, fluorokinolonokra, potenciált szulfonamidokra és tetraciklinekre is rezisztensek. Ilyen baktériumok a 90-es évektől kezdve háziállatainkból, így baromfiból és pulykából is izolálásra kerültek (Xian-Zhi Li és mtsai 2007). Salmonellák esetében a kromoszomális AmpC-kódoló gént még nem mutatták ki, azonban más, több antibiotikum ellen is védelmet nyújtó kromoszomális géncsoportot, az ún. SG1-et (*Salmonella genomic island*) már felfedezték. Plazmidon kódolt, az *E. coli*éhoz hasonló AmpC-szerű  $\beta$ -laktamázok elterjedése a *Salmonella* genusban is várható, bár előfordulásuk egyelőre jóval ritkább (Winokur és mtsai 2001). A laktamázok másik, igen nagy jelentőséggel bíró típusai az ún. ESBL (extended spectrum beta-lactamases=szélesített spektrumú  $\beta$ -laktamázok) enzimek. Ezek az enzimek a Bush-féle 2be és az Ambler-féle A, illetve D csoportba tartoznak. Legtöbbször már a természetben meglévő, szűkebb spektrumú laktamáz enzimek pontmutációs változatai. Jelentőségük abban áll, hogy az aminopenicillinek, a karboxipenicillinek és az ureidopenicillinek mellett a cefalosporinokkal szemben is magasfokú rezisztenciát okoznak. Leggyakoribb az ún. CTX-M enzim (cefotaximáz), amelynek béta-laktám-rezisztenciát hordozó plazmidján más antibiotikumok elleni rezisztenciagéneket is találunk. Jelentős különbség azonban a fenti, AmpC-szerű laktamázokhoz képest, hogy a cefamicineket nem képesek elbontani, és klavulánsavval gátolhatók. Mindkét enzimcsoport kiemelkedő jelentőséggel bír azonban, hiszen a fenti enzimeket kódoló gének gyakran fordulnak elő kapcsolatosan transzpozonokkal/integronokkal, illetve más antibiotikumokkal szembeni rezisztencia génjeivel, vagyis potenciálisan hozzájárulhatnak a multidrug-rezisztens baktériumok körének gazdagításához (Xian-Zhi Li és mtsai 2007). Pasteurellák esetében is leírásra kerültek különböző  $\beta$ -laktamázok a TEM és a ROB alosztályokból (Naas és mtsai 2001, Rosenau és mtsai 1991), ezek előfordulása azonban jóval ritkább, így klinikai jelentőségük is kisebb.

3. A  $\beta$ -laktám és  $\beta$ -laktamázgátló kombinációk elleni rezisztencia harmadik, viszonylag nagy jelentőséggel rendelkező formája az egyébként érzékeny baktériumok sejtfal-permeabilitásának megváltozása, mely így nem engedi át az antibiotikumokat olyan mennyiségben, hogy a sejtfalszintézis-gátló hatás kialakulhasson. Ehhez járulhat hozzá bizonyos esetekben a hatóanyagokat az extracellularis térbe juttató efflux-pumpák jelenléte is (Xian-Zhi Li és mtsai 2007).

4. Az amoxicillin-klavulánsavval szembeni rezisztencia negyedik formája főleg a humán eredetű *S. aureus*, *S. epidermidis* törzsek néhány százalékában jelentkezik. Hasonló mechanizmus figyelhető meg a szintén humán eredetű *S. pneumoniae* és *E. faecium* esetében. Ezek a baktériumok rezisztensek a legtöbb  $\beta$ -laktámvázas antibiotikumra, így a klavulánsavval potencírozott amoxicillinre is. Ennek oka, hogy a cytoplasmaticusan helyeződő PBP-k képződését irányító gének mutációja következtében olyan szerkezetű transzpeptidázok termelődnek, amelyek képtelenek az amoxicillin (és minden egyéb  $\beta$ -laktám-vázis antibiotikum) megkötésére. Ezért ezen ún. MRSA- és MRSE-törzsek (Meticillin-Rezisztens *Staphylococcus aureus/epidermidis*) ellen a kombináció hatástalan. Ezek a kórokozók komoly problémát jelentenek a humán gyógyászatban, ugyanis előfordulásuk – főleg Ázsiában – folyamatosan nő. Ilyen baktériumok háziállatainkban ritkán fordulnak elő. Egy hazánkban végzett 2001-es vizsgálat szerint 1921, állatokból izolált *Staphylococcus*-törzs közül csupán 6 bizonyult oxacillin-rezisztensnek (Kaszanyitzky és mtsai 2003).

A  $\beta$ -laktámokkal szembeni rezisztencia az *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumfajokban egyre komolyabb méreteket ölt világszerte és hazánkban egyaránt. Egy USA-ban végzett felmérésben legeltetésen alapuló és hagyományos (mélyalmos) felnevelést alkalmazó baromfiállományokból származó mintákat vizsgáltak a *Salmonella*-fertőzöttség és a salmonellák antibiotikum-rezisztenciájának felderítése céljából. A legelőről begyűjtött minták 33%-ából és a mélyalmos gazdaságban gyűjtött minták 47%-ából sikerült kitenyészteni *salmonellákat*. A legelői izolátumok 11%-a, a hagyományos gazdaságból származók 69%-a multidrug-rezisztensnek bizonyult - vagyis rezisztensek voltak három vagy annál több antibiotikum-csoportra (ezen belül ampicillinre és klavulánsavra is) (Siemon és mtsai 2007). Az intenzív baromfitartás és az ezzel járó antibiotikum-használat tehát jelentősen hozzájárul a bakteriális rezisztencia terjesztéséhez világszerte. Egy Olaszországban végzett felmérés alapján emberekből és állatokból izolált *S. Typhimurium* törzsekben az ampicillin-rezisztencia aránya 67,6% (Graziani és mtsai 2008). Egy Egyesült Államokban készült felmérés ezzel szemben igen alacsony - ampicillinre 3,8%-os, amoxicillin-klavulánsavra mindössze 0,8%-os - rezisztencia-gyakoriságot állapít meg állatokból izolált salmonellák esetén (Dargatz és mtsai 2002). Parveen és mtsai (2007) szintén az Egyesült Államokban végzett húsvizsgálatokból izolált salmonellák esetében 52,9%-os ampicillin-rezisztenciát írnak le. Egy vietnami vizsgálatból kiderül, hogy csirkékből izolált *E. coli* törzsek 50,5%-a volt rezisztens ampicillinre és amoxicillinre egyaránt (Thi Thu Hao Van és mtsai 2008). Jól látható tehát, hogy a rezisztencia-helyzet térben és időben igen változékony. A fenti jelenségek megjelenését hazai baromfiállományokban is igazolni lehet. Az MGSZH-ÁDI (Mezőgazdasági

Szakigazgatási Hivatal Állatgyógyászati Diagnosztikai Igazgatósága) által vizsgált *E. coli* törzsek aminopenicillinre és aminopenicillin+enzimgátló kombinációra való érzékenységének folyamatos csökkenését mutatják be a 17. és 18. táblázatok. Ezekből kiolvasható, hogy az érzékeny törzsek jelentős csökkenése mellett a rezisztens és mérsékelt érzékeny törzsek aránya évről-évre nőtt.

**17. táblázat: baromfiból származó *E. coli* törzsek érzékenysége ampicillinre, valamint az amoxicillin-klavulánsav kombinációra a 2001-2004 időszakban az MGSzH-ÁDI adatai szerint**

Év	2001			2002			2003			2004		
n (mintaszám)	314			183			157			151		
érz. / rez. / mérs. érz.	É	R	M	É	R	M	É	R	M	É	R	M
amoxicillin/klavulánsav	95,9	0,3	3,8	80,9	2,2	16,9	82,8	5,7	11,5	76,8	2,6	20,5
ampicillin	61,5	29,6	8,9	52,5	36,6	10,9	55,4	34,4	10,2	41,7	41,1	17,2

forrás: nem közölt adatok, a kutatók engedélyével

**18. táblázat: baromfiból származó *E. coli* törzsek érzékenysége ampicillinre, valamint az amoxicillin-klavulánsav kombinációra 2006-ban az MGSzH-ÁDI adatai szerint**

Év	2006		
n (mintaszám)	167		
érz. / rezisztens / mérs. érz. (%)	É	R	M
amoxicillin/klavulánsav	60	12	28
ampicillin	35	51	13

forrás: nem közölt adatok, a kutatók engedélyével

A 19. táblázat *S. enterica* törzsek érzékenységét mutatja ampicillinre és az amoxicillin-klavulánsav kombinációra. Az adatokból tükröződik a salmonellák kifejezett érzékenysége a kombinációra, mely 2001-ről 2006-ra nem csökkent, sőt növekedett. Az irodalomban olvasható rezisztens salmonellák előfordulása tehát Magyarországon kevésbé kifejezett.

**19. táblázat: baromfiból származó *Salmonella*-törzsek érzékenysége ampicillinre, valamint az amoxicillin-klavulánsav kombinációra a 2001. és 2006. évben az MGSzH-ÁDI adatai szerint**

Év	2001			2006		
n (mintaszám)	105			102		
érz. / rezisztens / mérs. érz. (%)	É	R	M	É	R	M
amoxicillin/klavulánsav	96	2	2	100	0	0
ampicillin	85	15	0	95	5	0

forrás: publikálatlan adatok, a kutatók engedélyével

A salmonellák és az *E. coli* közötti jelentős érzékenységbeli különbséget egy 2005-ös, átfogó dán felmérés is bemutatja (DANMAP 2005). Ebből kiderül, hogy a baromfiból izolált *S. enterica* törzsek 100%-a érzékeny volt ampicillinre és az amoxicillin-klavulánsav kombinációra is. A MIC-értékek 1 és 2 µg/ml között változtak. *E. coli* esetében ugyanakkor a baromfiból izolált törzsek



csak 85%-a volt érzékeny ampicillinre, bár 100% érzékeny volt a kombinációra. A MIC-értékek jelentősen magasabbak bizonyultak, 2 és 64 µg/ml közé estek. A magyarországi és dán viszonyok összehasonlításakor feltűnik, hogy hazánkban jóval gyakoribb *E. coli* esetében a rezisztencia előfordulása. Ennek magyarázataként megemlíthetjük, hogy Dániában az antibiotikumok állatgyógyászati felhasználását kivételesen szigorú előírások szabályozzák, melynek következtében számos antibakteriális szer elleni rezisztencia gyakorisága az elmúlt évtizedben számottevően csökkent.

## 4.2. ANYAG ÉS MÓDSZER

Az érzékenységi vizsgálatok célja, hogy megállapítsuk, egy adott kórokozó baktérium szertett-e másodlagos rezisztenciára a vizsgált antibiotikummal, illetve antibiotikum-kombinációval szemben. Kísérletünk során házityúkból és pulykából izolált *E. coli* (n=103), *P. multocida* (n=85) és *S. enterica* (n=118) fajba (*S. Enteritidis* (n=71), *S. Infantis* (n=18) és *S. Typhimurium* (n=29) szerovariánsok) tartozó törzsek (forrás: *Fővárosi és Pest megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Központ Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatósága*) amoxicillinnel, illetve amoxicillin-klavulánsavval szembeni érzékenységét vizsgáltuk agarhígításos módszerrel. E módszer a CLSI (2008) előírásai alapján a legkisebb gátló koncentráció (MIC-érték) meghatározásának referenciamódszere. Az így meghatározott MIC-érték ( $\mu\text{g/ml}$ ) az antibiotikumok bakteriosztatikus hatásának kvantitatív jellemzésére szolgál. Az így kapott MIC-értékeket a későbbiekben a farmakokinetikai paraméterekkel együtt elemezve felhasználtuk a terápiás hatékonyság elemzésére.

### A MIC-értékek meghatározásának menete

#### a. Müller-Hinton leves és agargél elkészítése és sterilizálása

A Müller-Hinton agar (MH-agar) a rezisztencia-vizsgálatok leggyakrabban használt agartípusa, amely megfelelő körülményeket teremt a legtöbb igénytelen baktériumfaj növekedéséhez. Az MH-leves készítésekor 22,0 g MH-port oldottunk fel 1,0 liter desztillált vízben, majd a kapott oldatot gázlángon való hevítés után autoklávban sterilizáltuk 121 °C-on, 15 percig. A *P. multocida*-törzsek érzékenységi vizsgálatához - figyelembe véve azok nagyobb tápanyag-igényét - 5%-os MH-véresagart készítettünk, amelyhez steril borjúvért használtunk fel.

#### b. Baktériumok szuszpendálása Müller-Hinton levesben

A vizsgált baktériumtörzseket a rezisztencia-vizsgálat előtt 24 órával MH-agarra (*P. multocida* esetében véresagarra) szélesztettük, majd 37 °C-on inkubáltuk. A vizsgálat során valamennyi törzs 1-1 telepéből rendre  $10^7$  CFU/ml koncentrációjú szuszpenziót készítettünk 1 ml Müller-Hinton levesben, illetve *P. multocida* esetében agy-szív infúziós levesben (BHI = brain-heart infusion). A kémcsöveket Vortex mixerrel alaposan összeráztuk, míg végül kellően opálos szuszpenziót kaptunk (a szuszpenzió optikai denzitása egyenes arányban áll a benne található csírák számával). A kapott szuszpenziók csíraszámát 10-es alapú hígítási sor elkészítésével, majd a CFU-k számlálásával ellenőriztük.

### c. Amoxicillin és amoxicillin-klavulánsav törzsoldatok elkészítése

A kristályos hatóanyagok feloldására szolgáló foszfátpuffert a CLSI előírásai szerint készítettük. A puffer készítése során 50,0 ml 0,2 M koncentrációjú  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -oldathoz 5,2 ml 0,2 M koncentrációjú NaOH-oldatot adtunk, majd az így kapott keveréket 200,0 ml-ig hígítottuk steril desztillált vízzel. Az amoxicillin-törzsoldat készítésekor 32,0 mg kristályos amoxicillint oldottunk 10,0 ml foszfátpufferben, így végeredményképpen 3200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  koncentrációjú törzsoldatot kaptunk. Az 1600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  koncentrációjú klavulánsav-törzsoldat készítésekor 16,0 mg kristályos klavulánsavat oldottunk fel 10,0 ml foszfátpufferben.

### d. Az agarhígításos módszer kivitelezése

Az amoxicillin-munkaoldatok elkészítésekor a *Salmonella* és *Pasteurella*-törzsek vizsgálatához a fentiekben leírt 1,0 ml amoxicillin-törzsoldathoz 4,0 ml MH-levest mértünk, így 640  $\mu\text{g}/\text{ml}$  koncentrációjú oldatot kaptunk, melyet 19,0 ml folyékony MH-agarral hígítottunk tovább, így az ebből kiöntött táptalaj végső koncentrációja 32  $\mu\text{g}/\text{ml}$  lett. Kettes alapú hígítási sor készítésével így az agarlemezeken 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 és 0,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hatóanyag-koncentrációt kaptunk. Az *E. coli* érzékenységi vizsgálatokor magasabb antibiotikum-koncentrációjú munkaoldatot készítettünk, hiszen az irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy ezen baktérium esetében gyakoribb az amoxicillin-rezisztencia, illetve magasabbak a várható MIC-értékek. A munkaoldat 4,0 ml törzsoldatot és 1,0 ml MH-levest tartalmazott, így koncentrációja 2560  $\mu\text{g}/\text{ml}$ -nek adódott. Az agarlemezek amoxicillin koncentrációja pedig rendre 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 és 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  lett.

Az amoxicillin-klavulánsav törzs- és munkaoldatokban a CLSI előírásai alapján 2:1-re állítottuk be a két hatóanyag koncentrációjának arányát. Míg az amoxicillin hígítási sorának elkészítését a fentiek alapján végeztük, a klavulánsav hígítási sorának elkészítésekor 1,0 ml klavulánsav-törzsoldathoz 4,0 ml Müller-Hinton levest mértünk, majd szintén kettes alapú hígítási sort készítettünk, ahol így rendre 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5,0 és 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  koncentráció-értékeket kaptunk. Az agarlemezek hatóanyag-koncentrációi így pasteurellák és salmonellák vizsgálata esetében 32/16, 16/8, 8/4, 4/2, 2/1, 1/0,5, 0,5/0,25 és 0,25/0,125  $\mu\text{g}/\text{ml}$  értékeket, míg *E. coli* vizsgálata esetén 64/32, 32/16, 16/8, 8/4, 4/2, 2/1, 1/0,5 értékeket adtak.

### e. Lemezek beoltása

A különböző gyógyszer-koncentrációjú agarlemezeknek az adott baktériumtörzs sorszámaival megjelölt helyére 5-5  $\mu\text{l}$ -t pipettáztunk a baktérium-szuszpenziókból, amely megfelelt kb.  $5 \times 10^5$  CFU telepformáló egységnek. A cseppek megszáradása után a lemezek 24 órára 37 °C-os termosztátba kerültek.

## f. Elbírálás

A kinőtt telepeket makroszkópos képük alapján a következőképpen értékeltük:

- +++ = markánsan növekvő, homogén telep
- ++ = a telep szemecskézett, inhomogén
- +
- = a telep növekedése gátolt

A vizsgálat részeként meghatároztuk az adott törzsre jellemző **MIC-értéket**, amely az antibiotikum azon legkisebb mennyisége ( $\mu\text{g}$ ) 1 ml térfogatban, amely már gátolja a baktériumtörzs szaporodását. Meghatároztuk továbbá az összes baktériumtörzs 50%-ának, illetve 90%-ának növekedését gátló antibiotikum-koncentrációkat is (**MIC<sub>50</sub>** és **MIC<sub>90</sub>** értékek). Ezen eredményeinket összevetettük a CLSI által (2008) meghatározott ún. **break-point**-értékekkel, ami a legmagasabb MIC-küszöbérték, amely tájékoztatást nyújt az antibiotikumnak egy adott kórokozó elleni terápiás célú alkalmazásának sikerességéről. Azon kórokozókat, amelyeknek a MIC-értékei e küszöbértéken vagy alatta vannak, szaporodásukban gátolja az antibiotikum - feltéve, hogy a kezelt egyed immunkompetens állapotban van. Ez az érték amoxicillinnél 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , az amoxicillin-klavulánsav kombinációnál 8/4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . A 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , illetve 16/8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  amoxicillinre, illetve amoxicillin-klavulanátra vonatkozó MIC-értékekkel rendelkező baktérium-törzsek mérsékelten érzékenyek a fenti hatóanyagokra. Az ennél nagyobb MIC-értékek rezisztenciára utalnak.

### 4.3. EREDMÉNYEK

A baktériumok érzékenységét amoxicillinre, illetve a klavulánsavval potenciált hatóanyagra az agarhígításos módszerrel vizsgáltuk, ahol minden esetben a kontroll, vagyis antibiotikumot nem tartalmazó talajok megtekintésével kezdtük az értékelést. A baktériumok a kontroll táptalajokon kivétel nélkül markánsan növekedtek.

#### 4.3.1. Az *E. coli* törzsek érzékenysége amoxicillinre

Az *E. coli* törzsek növekedését vizsgálva megállapítottuk, hogy a 0,5-1 µg/ml koncentráció-intervallumba eső táptalajokon az összes baktériumtörzs növekedése zavartalanul zajlott, gátlás jelét nem tapasztaltuk. A 2-4 µg/ml koncentrációjú lemezekon a baktériumok többsége szintén markánsan növekedett, bizonyos törzseknél azonban már a gátlás jeleit tapasztaltuk. Azon törzsek túlnyomó többsége, melyeket a 4 µg/ml koncentrációjú amoxicillin-koncentráció sem gátolt, rezisztensnek bizonyult a hatóanyagra (MIC $\geq$ 128 µg/ml). A MIC-értékek megoszlása a vizsgált törzsek esetében a 20. táblázatban látható, míg részletes megfigyeléseink a Függelék 17. táblázatában olvashatók. A táblázatban az állatfajt és a szervet is feltüntettük, ahonnan a baktérium izolálásra került (M=monitoring vizsgálat, bélből való kitenyésztés).

#### 4.3.2. Az *E. coli* törzsek érzékenysége a 2:1 arányú amoxicillin-klavulánsav kombinációra

A fenti *E. coli* törzsek érzékenységét az amoxicillin-klavulánsav kombinációra a Függelék 18. táblázata szemlélteti. A MIC-értékek megoszlása a vizsgált törzsek esetében a 20. táblázatban látható.

20. táblázat: Baromfiból izolált *E. coli* törzsek MIC-értékeinek megoszlása amoxicillinre és amoxicillin-klavulánsavra (MIC<16 érzékeny, MIC=16 mérsékelten érzékeny, MIC>16 rezisztens)

Hatóanyag	MIC (µg/ml)								
	$\geq 128$	64	32	16	8	4	2	1	0,5
amoxicillin (n=103)	59	0	0	0	20	17	7	0	0
amoxicillin-klavulánsav (n=103)*	2	2	11	32	27	22	7	0	0

\* amoxicillinre vonatkoztatva

### 4.3.3. A *S. enterica* törzsek érzékenysége amoxicillinre

Vizsgálataink során összesen 118, baromfiból izolált, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* és *S. Infantis* szerotípusba tartozó törzs érzékenységét vizsgáltuk a hatóanyagra. A kontroll és a 0,25 µg/ml amoxicillin-koncentrációjú talajokon valamennyi törzs markáns növekedést mutatott. A hatóanyag 2 µg/ml koncentrációja a törzsek túlnyomó többségének szaporodását már gátolta. A 32 µg/ml-es koncentrációjú hatóanyag sem volt képes gátolni azonban 7 törzs szaporodását. A MIC-értékek megoszlása a vizsgált *Salmonella*-törzsek esetében a 21. táblázatban látható, míg részletes megfigyeléseink a Függelék 19. táblázatában olvashatók.

### 4.3.4. A *S. enterica* törzsek érzékenysége a 2:1 arányú amoxicillin-klavulánsav kombinációra

A salmonelláknak a kombinációval szembeni érzékenységének vizsgálatakor kapott eredményeink mutatják, hogy a 0,5/0,25 µg/ml-os koncentráció-értékeknél nem tapasztaltunk csökkenést a szaporodás intenzitásában. Ennél nagyobb koncentráció-értékek azonban jelentősen csökkentették a törzsek szaporodási potenciálját, csupán az amoxicillinre rezisztens törzsek esetében haladták meg a MIC-értékek az 1/0,5 µg/ml-t. A MIC-értékek megoszlása a vizsgált törzsek esetében a 21. táblázatban látható, míg részletes megfigyeléseink a Függelék 20. táblázatában olvashatók.

21. táblázat: Baromfiból izolált *Salmonella*-törzsek esetében kapott MIC-értékek megoszlása amoxicillinre és amoxicillin-klavulánsavra (MIC<16 érzékeny, MIC=16 mérsékelten érzékeny, MIC>16 rezisztens)

Hatóanyag	MIC (µg/ml)							
	≥32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
amoxicillin (n=118)	7	0	1	5	76	29	0	0
amoxicillin-klavulánsav (n=118)*	0	3	3	0	9	103	0	0

\* amoxicillinre vonatkoztatva

### 4.3.5. A *P. multocida* törzsek érzékenysége amoxicillinre

Az általunk vizsgált 85 *P. multocida* törzs amoxicillinre mutatott érzékenysége az adott hatóanyag-koncentrációjú agarlemezeken a Függelék 21. táblázatában látható. A MIC-értékek megoszlása a vizsgált törzsek esetében a 22. táblázatban látható.

#### 4.3.6. A *P. multocida* törzsek érzékenysége a 2:1 arányú amoxicillin-klavulánsav kombinációra

Az általunk vizsgált 85 *P. multocida* törzs amoxicillin-klavulánsavra mutatott érzékenysége az adott hatóanyag-koncentrációjú agarlemezeken a Függelék 22. táblázatában látható, míg a MIC-értékek megoszlását az alábbi, 22. táblázat tartalmazza.

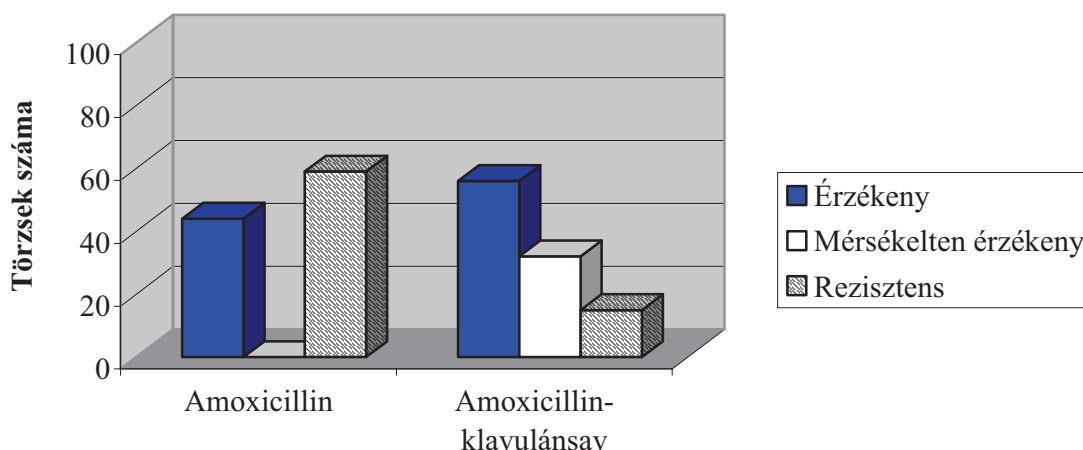
22. táblázat: Baromfiból izolált *P. multocida* törzsek esetében kapott MIC-értékek megoszlása amoxicillinre és amoxicillin-klavulánsavra (MIC<16 érzékeny, MIC=16 mérsékelten érzékeny, MIC>16 rezisztens)

Hatóanyag	MIC (µg/ml)								
	≥32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
amoxicillin (n=85)	12	3	3	2	2	20	32	8	3
amoxicillin-klavulánsav (n=85)*	0	1	2	7	12	36	26	1	0

\* amoxicillinre vonatkoztatva

#### 4.4. MEGBESZÉLÉS

A vizsgálatunkba bevont *E. coli*, *S. enterica*, illetve *P. multocida* fajba tartozó, baromfiból izolált törzsek érzékenysége amoxicillinre, valamint az amoxicillin-klavulánsav kombinációra jelentős eltéréseket mutatott a különböző baktériumfajok esetében. A megvizsgált *E. coli* törzseknél gyakori és nagyfokú rezisztenciát, kifejezetten magas MIC-értékeket tapasztaltunk. A vizsgálatba bevont *E. coli* törzsekre vonatkozólag az önálló amoxicillin MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub>-értékei  $\geq 128$   $\mu\text{g/ml}$ -nek adódtak. Ez a nagyfokú rezisztencia összhangban áll más szerzők korábbi megfigyeléseivel (Brinas és mtsai 2002, Giguere és mtsai 2006, Thi Thu Hao Van és mtsai 2008). Az amoxicillin-klavulánsav kombináció alkalmazásakor a MIC-értékek jelentősen csökkentek, azonban ez esetben is a MIC<sub>50</sub>-értéke 8  $\mu\text{g/ml}$ , MIC<sub>90</sub>-értéke pedig 32  $\mu\text{g/ml}$  lett a vizsgált törzsekre. Az érzékeny, mérsékelten érzékeny és rezisztens törzsek aránya amoxicillinre, illetve a klavulánsavval potencírozott hatóanyagra a 13. ábrán látható.



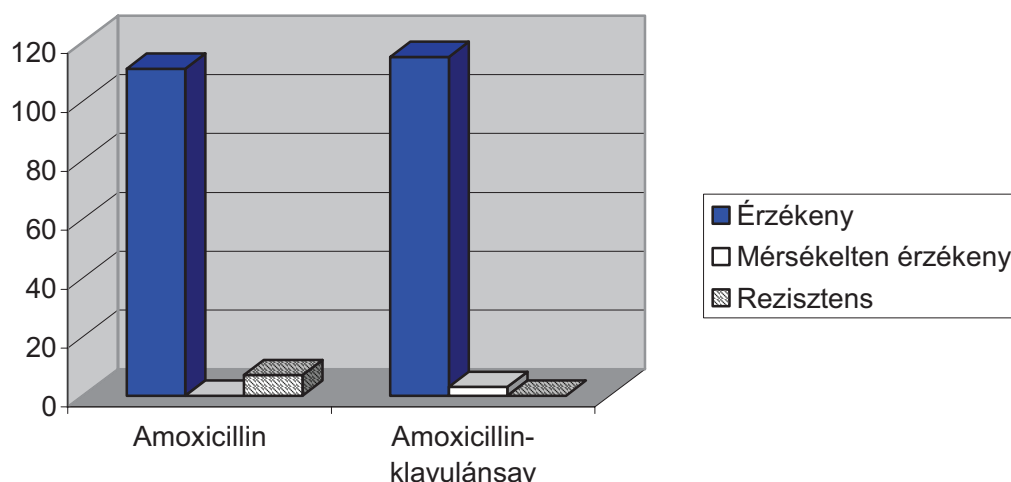
13. ábra: Érzékeny, mérsékelten érzékeny és rezisztens *E. coli* törzsek aránya (%) amoxicillinre, illetve az amoxicillin-klavulánsav kombinációra

A baktérium nagyfokú rezisztenciája részben változékonyságának, részben a plazmidokon keresztül gyorsan terjedő rezisztencia-mechanizmusoknak, valamint annak a számos  $\beta$ -laktamáz enzimnek köszönhető, melynek termelésére az *E. coli* képes. A MIC-értékek csökkenése a  $\beta$ -laktamázok széles körének gátlásával magyarázható (Giguere és mtsai 2006, Xian-Zhi Li és mtsai 2007). Azon törzsek esetében, amelyek azonban kromoszomális AmpC, vagy plazmidon kódolt AmpC-szerű laktamázokat termelnek, illetve az egyéb rezisztencia-mechanizmusok valamelyikét (csökkent sejtfal-permeabilitás, növekvő efflux, PBP-mutációk) fenotípusosan mutatják, a kombináció sem hatékony. Vizsgálatunkban az amoxicillinre érzékeny *E. coli* törzsek aránya



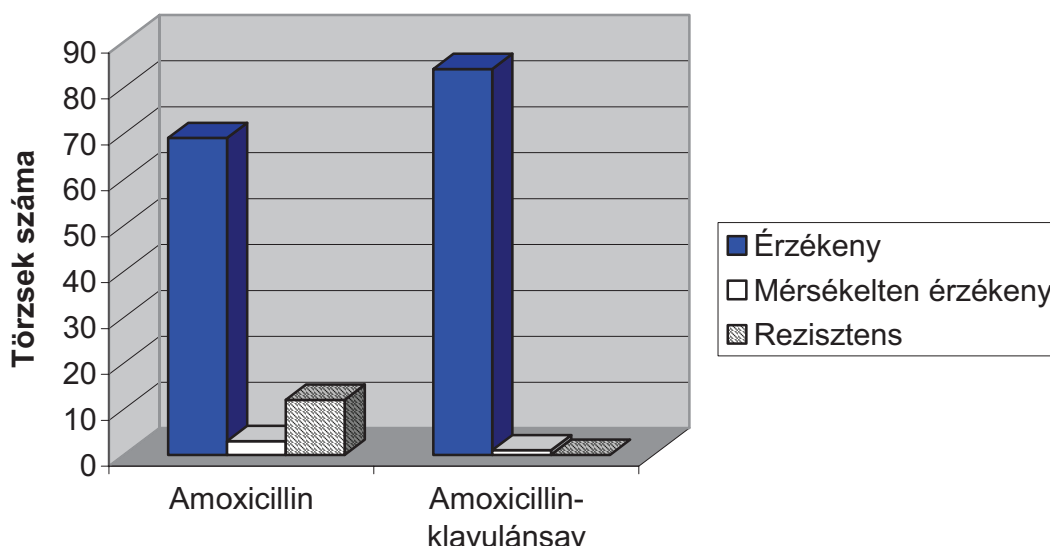
41,7%, míg a klavulánsavval potenciált hatóanyagra 64,1% volt. Az amoxicillin-klavulánsav kombináció alkalmazásának korlátai tehát egyre inkább előtérbe kerülnek, és nem csak a humán, hanem az állatgyógyászatban is egyre komolyabb problémát jelentenek.

Az általunk vizsgált *Salmonella*-törzsek esetében jelentősen alacsonyabb aktuális MIC-értékeket tapasztaltunk mind amoxicillin, mind a kombináció vizsgálatakor, mint az *E. coli* esetében. Ezen eredményeink összhangban állnak Dargatz és mtsai (2002), míg ellentmondanak Graziani és mtsai (2008), valamint Parveen és mtsai (2007) olaszországi és USA-beli felméréseinek. Esetünkben amoxicillinre 94%-os, amoxicillin-klavulánsavra 97,6%-os érzékenységet tapasztaltunk. A kombináció alkalmazásakor az önálló amoxicillinre kapott értékekhez viszonyítva kisebb MIC<sub>50</sub>-és MIC<sub>90</sub>-értékeket kapunk. Amoxicillinre a MIC<sub>50</sub>-érték 2 µg/ml-nek, a MIC<sub>90</sub>-érték pedig 4 µg/ml-nek adódott. A klavulánsavval potencírozott amoxicillin MIC<sub>50</sub>-értéke 1 µg/ml, MIC<sub>90</sub>-értéke pedig 2 µg/ml. Az érzékeny, mérsékelten érzékeny és rezisztens törzsek aránya amoxicillinre, illetve a klavulánsavval potencírozott hatóanyagra a 14. ábrán látható.



14. ábra: Érzékeny, mérsékelten érzékeny és rezisztens *S. enterica* törzsek aránya (%) amoxicillinre, illetve az amoxicillin-klavulánsav kombinációra

*P. multocida* esetében az irodalmi adatok alapján alacsonyabb rezisztencia-gyakoriságot és alacsonyabb MIC-értékeket vártunk (Andrews és mtsai 2004, Giguere és mtsai 2006, Kim és mtsai 1999, Lion és mtsai 2006, Pedersen és mtsai 2007). A vizsgálatunkba bevont törzseknél az amoxicillinre érzékeny törzsek aránya 82,3%, míg a kombinációra érzékenyeké 98,8% volt. Az amoxicillin MIC<sub>50</sub>-értéke 1 µg/ml, MIC<sub>90</sub>-értéke pedig 16 µg/ml volt ezekre a törzsekre. Amoxicillin-klavulánsav kombináció alkalmazásakor a MIC<sub>50</sub>-érték 1 µg/ml, a MIC<sub>90</sub>-érték pedig 4 µg/ml lett. Az érzékeny, mérsékelten érzékeny és rezisztens törzsek aránya amoxicillinre, illetve a klavulánsavval potencírozott hatóanyagra a 15. ábrán látható.



15. ábra: Érzékeny, mérsékelten érzékeny és rezisztens *P. multocida* törzsek aránya (%) amoxicillinre, illetve az amoxicillin-klavulánsav kombinációra

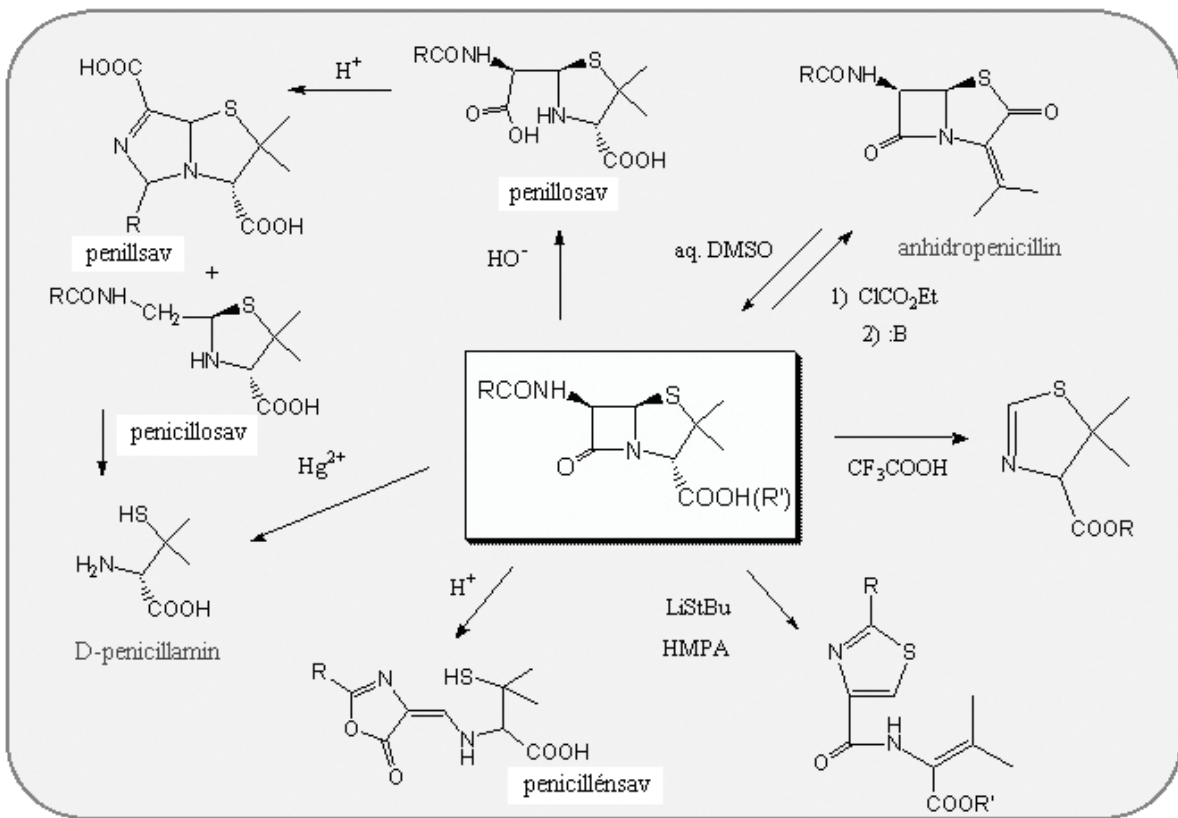
Eredményeinket összefoglalva elmondható, hogy a vizsgált *E. coli* törzsek esetében elterjedt és nagyfokú rezisztenciát tapasztaltunk amoxicillinre és a klavulánsavval potenciált hatóanyagra is. Az amoxicillin-rezisztencia ugyan a törzsek egy részénél „feltörhető” a kombináció alkalmazásával, azonban a rezisztencia-mechanismusok egy része ellen (AmpC, illetve AmpC-szerű laktamázok hiperprodukcója, csökkent sejtfal-permeabilitás, növekvő efflux-hatékonyság) a klavulánsavval potencírozott amoxicillin is hatástalan marad. A *Salmonella* és *Pasteurella* genusba tartozó törzsek esetében az érzékenységi adatok kedvezőbbek, a rezisztencia az önálló amoxicillinnel szemben is ritka. A rezisztens törzsek MIC-értékei, illetve a rezisztens törzsek aránya kivétel nélkül jelentősen csökkentek az amoxicillin-klavulánsav kombináció alkalmazásakor, így az amoxicillin-rezisztens törzsek a kombinációra érzékenyekké, vagy mérsékelten érzékenyekké váltak.

## 5. AZ AMOXICILLIN-KLAVULÁNSAV KOMBINÁCIÓ STABILITÁS-VIZSGÁLATA

### 5.1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Ahogy az a bevezetőben már említésre került, a  $\beta$ -laktám-vázás antibiotikumok vízben való feloldást követően igen bomlékony molekulák. Az **amoxicillin** fehér, gyakorlatilag szagtalan, kristályos por, amely vízben mérsékelten oldódik. Benzinben, szén-tetrakloridban, kloroformban oldhatatlan. Heterociklusos gyűrűje igen érzékeny a nukleofil jellegű reagensekre, s ez kémiai szerkezetváltozáshoz, gyakran gyűrűfelnyíláshoz vezet (Gunda 1999, Roubos és mtsai 2002). Kiemelt jelentősége van az alkalikus vagy semleges oldatban keletkező penicilloesavoknak, a savas oldatokban keletkező penicillénsavoknak, illetve a penillsavoknak és a penillosavoknak. A penicilloesavak keletkezését fémionok katalizálják (Gunda 1999), amelyek jelenléte üzemi körülmények között – pl. egy itatóedényben – kizárhatatlan. Ilyen vegyületek keletkeznek a bakteriális  $\beta$ -laktamáz enzimek hatására is.

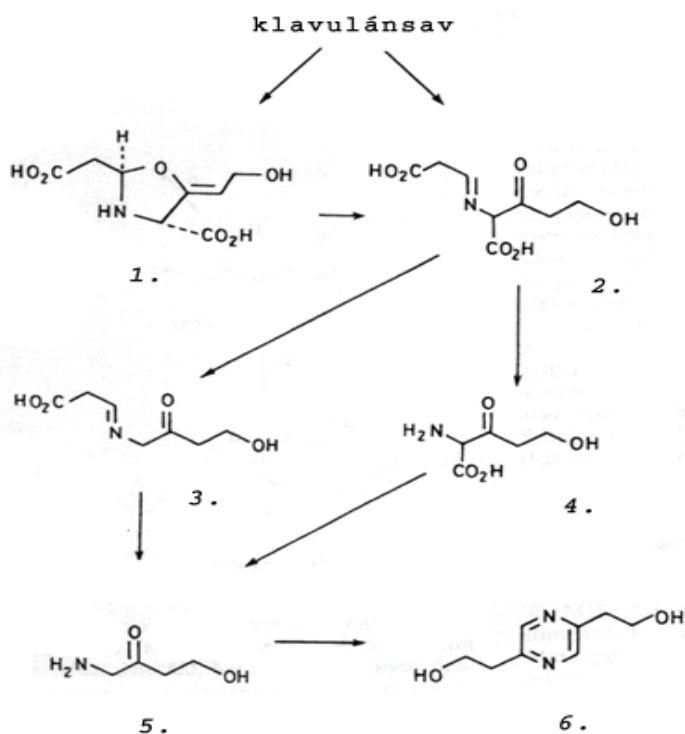
A 16. ábrán a penicillinek fontosabb átalakulásait követhetjük figyelemmel különböző reagensek hatására (Gunda 1999):



16. ábra: a penicillinek bomlási folyamatai (Gunda 1999)

Az amoxicillin bomlásának kinetikáját vizsgálva (Haginaka és mtsai 1981, Sunderland és mtsai 1986, Zia és mtsai 1977) a pH függvényében ábrázolt  $k_{pH}$ -értékek (pH miatti bomlás reakciósebességi állandója) másodrendű függvényt adnak, amelynek grafikonja parabola, mely görbében egy „vállszerű” törés látható. A függvény minimum értéke – tehát a bomlás sebességének minimuma - emiatt nem határozható meg pontosan. Kimondható azonban, hogy az amoxicillin stabilitásának maximuma az 5,8 és 6,5 közötti pH értéken van. Kombinációs partnerével, a kálium-klavulanáttal összehasonlítva (Haginaka és mtsai 1981) az amoxicillin kevésbé bomlékony: degradációs konstansa mintegy tízszer kisebb a laktamáz-inhibitoréhoz képest. Kombinációikban tehát a felhasználhatóság elsősorban az utóbbi vegyület bomlékonyságától függ.

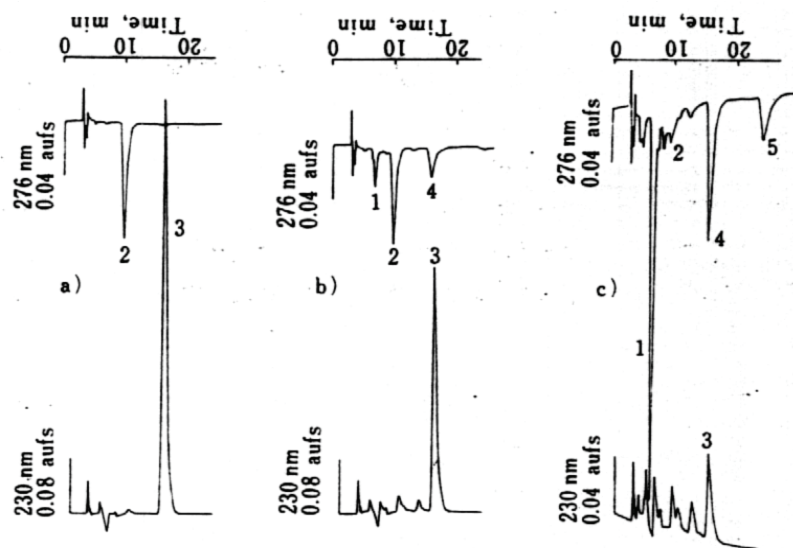
A **klavulánsav** rendkívüli módon higroszkópos vegyület, amely tulajdonsága azonban alkálifém-sóinál kevésbé kifejezett, ezért a *klavulánsav káliumsóját* használják a leggyakrabban. A vegyület fehér-piszkosfehér, szagtalan, kristályos por, vízben jól oldódik. A klavulánsav  $\beta$ -laktámgyűrűje vizes közegben a penicillinekéhez hasonló reakciókat mutat, bomlékonysága azonban fokozott azokhoz képest. Extrém módon higroszkópos vegyület révén, a nedvességre már nyomokban is érzékeny, sőt, az amoxicillin-trihidrát kristályvize is a vegyület instabilitásához vezethet. Finn és mtsai (1984) a klavulánsav hidrolízise során lezajló reakciókat és a keletkező vegyületeket vizsgálva felvázolták a hatóanyag bomlásának többlépcsős mechanizmusát. Eszerint a klavulánsav hidrolízise (17. ábra) során elsőként oxazolidin-gyűrűs vegyület (1.) keletkezik, amely igen gyakran az imin-formává (2.) tautomerizálódik. Nem ritka, hogy az alapvegyületből első lépésként közvetlenül ez a forma keletkezik. A bomlási reakció végterméke egy *amino-ke-ton* lánc (5.), amelyet azonban dekarboxilált-imin (3.) vagy  $\alpha$ -amino- $\beta$ -ketosav (4.) intermedierek kialakulása előz meg. Az amino-ke-ton savas közegben stabil maradhat, azonban semleges vagy bázikus környezetben a bomlás *pirazin* (6.) keletkezését eredményezheti. A reakciók során 1 mol klavulánsavból 1 mol acetaldehid és 2 mol szén-dioxid is keletkezik. Megfigyeléseik alapján semleges oldatban a klavulánsav bomlási termékeinek 83%-a a *pirazin* lett,  $\lambda = 276$  nm elnyelési maximummal. Ezzel szemben savas oldatban (0,2 M HCl) az *amino-ke-ton*-hidroklorid volt a produktumok fő alkotója, a pirazin nyomokban sem jelent meg a mérések során. Bázikus közegben (0,02 M KOH) a reakciók lefolyásának megfelelően az első percekben csak amino-ke-tont lehetett detektálni, az idő előrehaladtával azonban egyre nagyobb mennyiségben jelent meg a pirazin.



17. ábra: a klavulánsav bomlása vizes közegben (Finn és mtsai 1984)

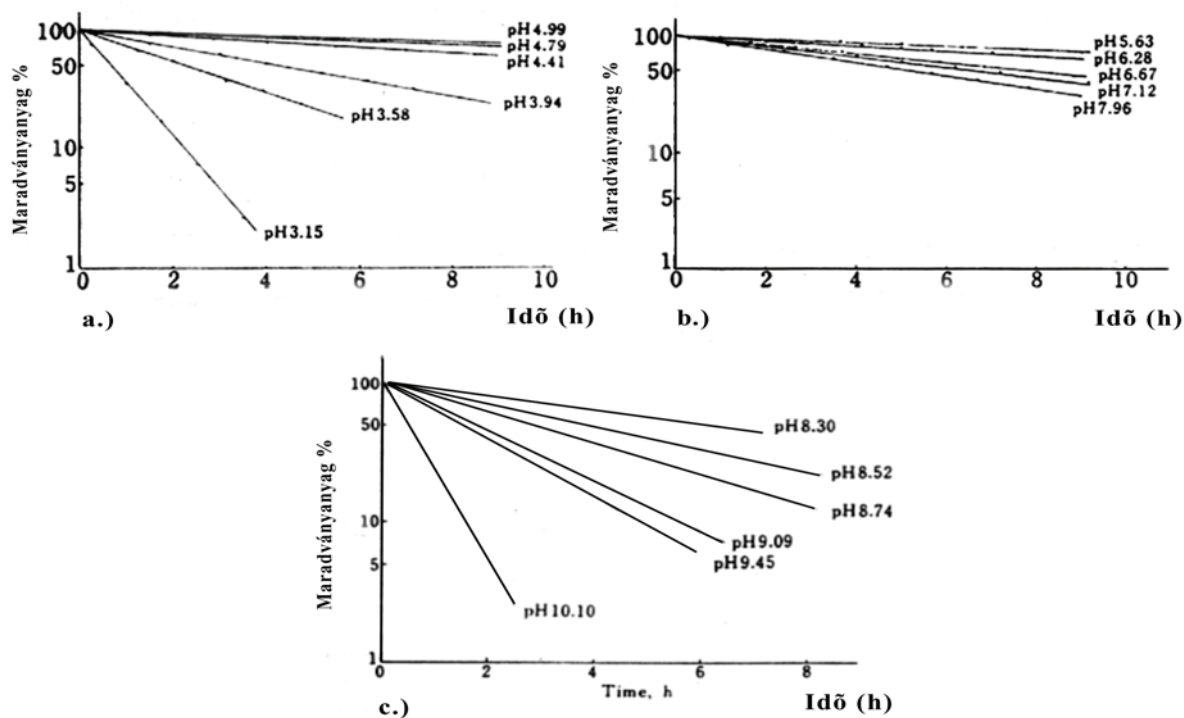
A kálium-klavulanát, mint a kombinációkban leggyakrabban használt só, a legkevésbé bomlékony, ennek ellenére kombinációs partnereinél kivétel nélkül érzékenyebb, ezért már a felfedezése utáni évtizedekben számos kinetikai vizsgálatot végeztek bomlásának alaposabb megismerésére.

Haginaka és mtsai (1981) a máig legátfogóbb vizsgálatot végezték UV-detektoros HPLC-módszer alkalmazásával. A klavulánsav stabilitását vizsgálták vizes oldatban, adott hőmérsékleten ( $T=308K=35^{\circ}C$ ) és ionerősségnél ( $\mu=0,5$ ). A kísérletek során a HPLC készülék mellé két, sorba kötött, változtatható hullámhosszú UV-detektort használtak, amellyel a klavulánsavnak és bomlási termékeinek mennyiségi viszonyait kísérték figyelemmel. A pH beállítását különböző pufferoldatokkal végezték, amelyek a pH-tól függően citrát-, acetát-, foszfát-, borát-, és karbonátpufferek voltak. A 18. ábrán látható kromatogramok a hatóanyag feloldása utáni 1., 7. és 24. órában készültek, pH=7,83 mellett. A klavulánsav elnyelési maximumának (3. csúcs) vizsgálata alapján meghatározták, hogy a hatóanyag 1 óra eltelte után kb. 85 %-a, 7 óra után kb. 50 %-a, 24 óra után pedig kb. 10 %-a maradt bomlatlanul. A degradációs termékek (1., 2., 4., 5. csúcs) abszorpciós maximumai ezzel párhuzamosan változtak az ábrán látható módon.

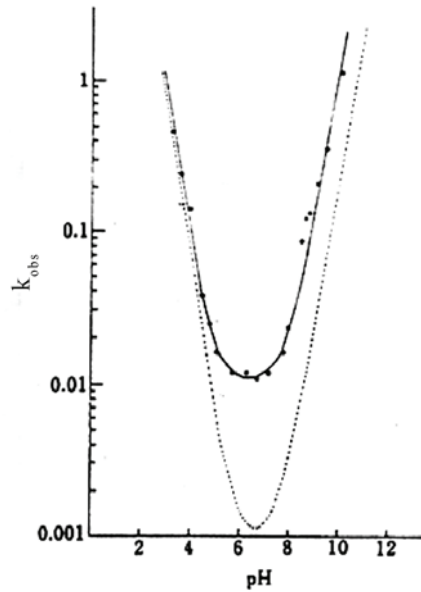


18. ábra: a klavulánsav és bomlástermékei a kromatogramokon 1h(a.), 7h(b.) és 24h(c.) eltelte után (Haginaka és mtsai 1981)

Vizsgálataikat különböző pH-jú oldatokra is kiterjesztették. Ezeknek a reakcióknak a kinetikáját vizsgálva, a degradációs függvények adott pH-értéken elsőrendűnek bizonyultak ( $T=35^{\circ}\text{C}$ ,  $\mu=0,5$ , puffer-konc.=0,3M), tehát az idő függvényében ábrázolva a maradványanyagok százalékos arányának logaritmusát, a függvény lineáris. A 19. ábrán láthatóak a vizsgálati eredmények savas, semleges és alkalikus oldatban.



19. ábra: a klavulánsav elsőrendű bomlási kinetikája savas(a.), semleges(b.) és alkalikus(c.) közegben (Haginaka és mtsai 1981)



20. ábra: a pH hatása a klavulánsav bomlási sebességi állandójára – a teljes vonal az elméleti, a pontozott vonal a mért értékeket ábrázolja (Haginaka és mtsai, 1981)

A pH hatása a klavulánsav bomlási sebességére ( $k_{pH}$ ) a 20. ábrán látható. A pH függvényében ábrázolva a  $k_{pH}$ -t, az összefüggés másodrendű, a grafikon parabola, amelynek minimum-értéke adja azt a pH-értéket, ahol a klavulánsav a legkevésbé bomlékony. Az ábrázoláshoz az értékeket az alábbi egyenlet alapján számolták:

$$k_{pH} = k_{H_2O} + k_{HAH} + k_{OH}(2 \cdot 10^{-14}/a_H),$$

ahol  $k_{pH}$  a pH miatti bomlás reakciósebességi állandója,  $k_{H_2O}$  a vizes közegben végbemenő spontán bomlás sebességi állandója,  $k_H$  és  $k_{OH}$  a protonok és hidroxid-ionok által katalizált reakciók sebességi állandói,  $a_H$  pedig az üvegelektóddal mért proton-aktivitás. A mérés eredményei a következők lettek:  $k_{H_2O} = 1,07 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ ,

$k_H = 7,64 \times 10^2 \text{ mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,  $k_{OH} = 6,14 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , amelyekkel számolva a klavulánsav stabilitásának becsült maximuma **pH = 6,39**-nél található.

Roubos és mtsai (2002) a klavulánsav bomlását vizsgálták *Streptomyces clavuligerus* tenyészetekben. A klavulánsav 30°C-on és pH=7,0 értéken vizsgált táptalajokon mért degradációs függvényei elsőrendűnek bizonyultak, s két komponens esetében lefutásuk nagyban függött ezen anyagoknak a táptalajbeli koncentrációjától. Míg a nyomelemek, a vas, a glutamát és a glicerin jelenléte esetében nem találtak a reakciósebességi állandóban szignifikáns eltéréseket ( $k_d = 0,0046$ – $0,0059 \text{ h}^{-1}$ ), addig az ammónium jelentősen megnövelte ( $k_d = 0,0114 \text{ h}^{-1}$ ), míg a magnézium ( $k_d = 0,0029 \text{ h}^{-1}$ ) csökkentette azt.

Az irodalmi adatokat összefoglalva tehát elmondható, hogy az amoxicillin-klavulánsav kombinációban szereplő laktámvázis antibiotikumok bomlékonysága nagyban függ a pH-tól (Bersanetti és mtsai 2005, Haginaka és mtsai 1981, Sunderland és mtsai 1986), és vélhetően a fémionok jelenlététől, így a vízkeménységtől is (Gunda 1999, Roubos és mtsai 2002), ez utóbbi jelenségre azonban irodalmi adatok nem állnak rendelkezésre.

## 5.2. ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgálataink során egy amoxicillin-trihidrátot és kálium-klavulanátot 4:1 arányban tartalmazó 62,5% össz-hatóanyagtartalmú vízdékony por („A” termék) stabilitását vizsgáltuk, illetve hasonlítottuk össze egy referencia-készítménnyel (Amoksiklav 62,5% vízdékony por, LEK, Szlovénia). Célkitűzésünk három kérdés köré csoportosult a.) a hatóanyagok feloldást követő stabilitása különböző keménységű fokú ivóvízmintákban; b.) a hatóanyagok feloldást követő stabilitása különböző pH-jú oldatokban; c.) a hatóanyagok feloldást követő stabilitása ivóvízben, fém- és műanyag itatóedényben. Vizsgálatainkat a gyakorlat számára potenciálisan legfontosabb szempontok alapján terveztük, a fenti vízminőségi tényezők alkalmazásával, a gyógyszer használati utasításában leírt – a törzsoldat készítésének megfelelő – bekeverési koncentrációban. (Az esetleges jövőbeni engedélyeztetés folyamán azonban további stabilitási vizsgálatokat az EMEA/CVMP/540/03 irányelvvel összhangban is el kell végezni, mely azonban bizonyos – általunk fontosnak tartott – környezeti tényezőket nem vesz figyelembe)

### Felhasznált anyagok, reagensek

A amoxicillin-trihidrát (99% tisztaságú) por a Sigma Aldrich Co.-tól került beszerzésre. A lítium-klavulanát (96% tisztaságú) port a LEK-Sandoz Co. Gyógyszergyár biztosította. HPLC-minőségű metanolt a Merck-től vásároltuk, míg a foszforsavat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pro anal.-t és a  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pro anal. a Reanal Magyarország Kft-től. A 2, 6 és 10 német keménységi fokú ivóvízmintákat ( $\text{GH}^0$ ) a Program 2000 Kft-től szereztük be és az Országos Közegészségügyi Központ Országos Közegészségügyi Intézete (Budapest) hitelesítette.

### Mintaelőkészítés

A termékek bomlását az alábbi körülmények között vizsgáltuk:

1. különböző keménységi fokú ivóvízmintákban (német keménységi fok,  $nk^\circ = 2, 6, 10$ )
2. különböző pH-jú pufferoldatokban (pH = 3,0, 7,0, 10,0, a foszfátpuffer molaritása 0,2 M)
3. műanyag- és fémedényben (csapvízzel, pH=7,09)

1. A 62,5 % hatóanyagtartalmú vízdoldható porokból 500 mg-hoz hozzáadtunk 175 ml ivóvizet, a kombináció törzsoldatának ajánlott bekeverési koncentrációjának megfelelően (20 gramm 62,5%-os por 7 liter ivóvízhez, tehát 2,85 mg amoxicillin- klavulánsav milliliterenként). A 2-es keménységű víz pH-ja 7,55, a 6-os keménységűé 7,58, míg a 10-es keménységi fokúé 7,56 volt, a vizsgálat üveglombikban történt.



2. A 62,5 %-os porokhoz hozzáadtunk 175 ml foszfátpuffert, melynek pH-ját előzőleg 3,0, 7,0 és 10,0 értékekre állítottuk be a következőképpen:

- 0,2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $pH = 3,0$ -ra állítva cc.  $\text{H}_3\text{PO}_4$ -val
- 0,2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $pH = 7,0$ -ra állítva 60 %-os KOH-dal
- 0,2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $pH = 10,0$ -ra állítva 60 %-os KOH-dal

A pH állandóságát pH-mérővel ellenőriztük. A vizsgálat üveglombikban történt.

3. A 62,5 %-os hatóanyagtartalmú vízdoldható porból 1000 mg-ot feloldottuk 350 ml ivóvízben ( $pH=7,09$ ), majd a kapott oldatokat műanyag és fém (horganyzott acél) baromfi-itatókba mértük.

Az így kapott oldatokat minden esetben 3 percig rázógéppel rázattuk, majd két lépésben 50-szeresükre hígítottuk a folyadékkromatográfiás mozgó fázissal. Az egyes oldatokból közvetlenül elkészítésük után („0.” óra, 100 % -os koncentráció), majd a 2., 6., 12. és 24. órákban 3-3 párhuzamos mintát vettünk, és ezekből 50  $\mu\text{l}$ -t injektáltunk a folyadékkromatográfba.

#### **A HPLC-módszer**

Az amoxicillin és a klavulánsav koncentrációit RP-HPLC módszerrel határoztuk meg Hoizey és mtsai (2002) módszere alapján Hewlett-Packard 1090A kromatográfval, Routin  $\text{C}_{18}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,0 mm-es kolonnákon. A detektáláshoz 210 nm hullámhosszon UV-detektort használtunk. A mozgófázis 5 v/v% metanolt és 95 v/v% 0,01M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -ot tartalmazott, kémhatását foszforsav segítségével állítottuk be pH 7,0-ra. A két hatóanyag koncentrációját egymással párhuzamosan, egy mérés során határoztuk meg. Az injektálási térfogat 50  $\mu\text{l}$ , az áramlási sebesség 1,0 ml/perc volt.

#### **Törzs- és munkaoldatok**

Az amoxicillin-törzsoldat készítéséhez 10,1 mg amoxicillin-trihidrát 99%-os standardet 100 milliliter mozgófázisban oldottunk fel, mely 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ -es koncentrációjú amoxicillin-trihidrát oldatnak felelt meg. A törzsoldat hígításával 40, 20, 10, 5, 2, 1 és 0,4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  koncentrációjú munkaoldatokat hoztunk létre. A lítium-klavulanát törzsoldat elkészítését hasonló módon végeztük, és így szintén 40, 20, 10, 5, 2, 1 és 0,4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  koncentrációjú munkaoldatokat kaptunk.

#### **Minőségi és mennyiségi meghatározás**

A kvalitatív meghatározás alapja az RP-HPLC-s módszernél a retenciós idő volt. Az ivóvízmintákban két hatóanyag retenciós ideje és a két komponens standardjainek retenciós ideje

közti eltérés nem haladhatja meg a  $\pm 2\%$ -ot. A kvantitatív meghatározáshoz a munkaoldatok segítségével elkészített kalibrációs görbét használtuk. A koncentráció-értékek kiszámítása az alábbi egyenlet alapján

$$C_x = \frac{(h_x - A_0) \cdot k}{A_1 \cdot 1000}$$

ahol  $C_x$  az amoxicillin-trihidrát, illetve a kálium-klavulanát koncentrációja a vízmintákban ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),  $h_x$  a csúcsmagasság (mAU),  $A_0$  a kalibrációs görbe metszéspontja az ordinátával (mAU),  $k$  a hígítás foka (esetünkben 50),  $A_1$  a görbe meredeksége ( $\text{mAU} \cdot \text{ml} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ ).

### **A módszer validálása**

A gyógyszeranyagok meghatározására használt analitikai módszereket az *EMEA (European Medicines Agency)/CVMP (Committee of Veterinary Medicine Products)* előírásai szerint, az *EMEA/CVMP/573/00* és *EMEA/CVMP/591/98* alapján következő tulajdonságaik segítségével jellemezzük:

#### Specifikusság

Módszerünk vizsgálatokor nem tapasztaltunk interferenciát a mátrixszal, és a kontroll mintánál a kapott jel kisebb volt a kimutathatósági határértéknél (LOD).

#### Linearitás

Az amoxicillin és klavulánsav linearitását a 0,4–40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ -es koncentráció-tartományban hétpontos kalibráció alapján vizsgáltuk. A lineáris regressziós analízis eredményei szerint az egyenesek korrelációs koefficiensei mindkét hatóanyag esetében 0,9999 voltak.

#### Visszanyerés

A visszanyerés vizsgálatára 3–3 különböző koncentrációban elkészített amoxicillin-trihidrát (0,7, 1,4, 2,8 mg/ml) és kálium-klavulanát (0,175, 0,350, 0,700 mg/ml) oldatot használtunk. Ezeket a kontroll mintához adtuk, majd meghatároztuk a hatóanyagok koncentrációit. Eredményeink a két hatóanyag esetében a Függelék 5. és 6. táblázatában láthatók, melyekből kiolvasható, hogy a visszanyerés (%) minden esetben 95% fölött volt.

#### Ismételhetőség és pontosság

Az ismételhetőség és a pontosság vizsgálatára 3-3 különböző koncentrációban elkészített amoxicillin-trihidrát (0,7, 1,4, 2,8 mg/ml) és kálium-klavulanát (0,175, 0,350, 0,700 mg/ml) oldatot

használtunk. Minden adott koncentráció-értéknél 3-3 párhuzamos meghatározást végeztünk. A módszer ismételhetőségének és pontosságának adatai a amoxicillin és klavulánsav esetében a Függelék 7. és 8. táblázatában olvashatók. Az általunk kapott variációs koefficiens (CV) és pontosság értékek kielégítik a kívánt követelményeket (<10%).

Kimutathatósági és meghatározási határérték (LOD és LOQ)

A két vegyület LOD és LOQ értékei a 23. táblázatban olvashatók.

**23. táblázat : LOD és LOQ értékek: amoxicillin**

Minta	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Amoxicillin	0,14	0,47
Klavulánsav	0,11	0,40

Stabilitás

Standard oldataink stabilitását szobahőmérsékleten, +5 °C-on és -20 °C-on vizsgáltuk az eluens folyadékban (5 v/v% Metanol, 95 v/v% 0,01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,0, 20 µg/ml koncentrációnál). A mintavételeket a „0” (100 %-os koncentráció), 6., 12., 24. és 48. órában végeztük. Megállapítottuk, hogy az eluensben oldott standard oldatok amoxicillin esetében -20 °C-on, legfeljebb 2 napig, míg a jóval bomlékonyabb klavulánsav esetén -20 °C-on, legfeljebb 12 óráig tárolhatók. (Ezen időpontokban az amoxicillin 3,4%-a, valamint a klavulánsav 6,0%-a elbomlik)

**Statisztikai analízis**

A hatóanyagok koncentrációinak logaritmusos csökkenése az idő függvényében a vizsgált oldatokban lineárisnak bizonyult, tehát elsőrendű kinetikát követett. A logaritmusos görbék lineárisnak bizonyultak  $r > 0,96$  (vízkeménység-vizsgálatok),  $r > 0,97$  (pH-vizsgálatok) és  $r > 0,97$  (ítatóedény-vizsgálatok) korrelációs koefficiensekkel. A hatóanyagok bomlásának vizsgálatokor a koncentráció-csökkenés logaritmusos görbéinek meredekségét hasonlítottuk össze kétmintás Student-féle t-próbával.

### 5.3. EREDMÉNYEK

Az eredményeket a kísérlet lépéseinek megfelelően az alábbiakban közöljük:

1. Különböző keménységi fokú ivóvízmintákban (német keménységi fok,  $nk^\circ = 2, 6, 10$ ) vizsgálva a két termékben az amoxicillin és a klavulánsav bomlását, a pontos, mért koncentráció-értékeket a Függelék 23. táblázatában közöljük. A táblázatban a 3-3 párhuzamos mérés eredménye látható a mintavételi időpontokban. Az eredmények grafikus ábrázolása a Függelék 3-6. ábráján látható (átlag $\pm$ SD).
2. Különböző pH-jú pufferoldatokban (pH = 3,0, 7,0, 10,0, a foszfátpuffer molaritása 0,2 M) vizsgálva a két termékben a hatóanyagok bomlását, a pontos, mért koncentráció-értékek a Függelék 24. táblázatában láthatók. A táblázatban a 3-3 párhuzamos mérés eredménye látható a mintavételi időpontokban. Az eredmények grafikus ábrázolása a Függelék 7-10. ábráján látható (átlag $\pm$ SD).
3. Műanyag- és fémedényben (csapvízben, pH=7,09) vizsgálva a két termékben a hatóanyagok bomlását, a pontos, mért koncentráció-értékek mindkét hatóanyagra a Függelék 25. táblázatában láthatók. A táblázatban a 3-3 párhuzamos mérés eredménye látható a mintavételi időpontokban. Az eredmények grafikus ábrázolása a Függelék 11-14. ábráján látható (átlag $\pm$ SD).

## 5.4. MEGBESZÉLÉS

### 5.4.1. Vízkeménységi vizsgálatok

Szignifikáns különbséget találtunk az amoxicillin bomlásának sebességében az „A” termékben ( $p < 0,05$ ), a  $\text{GH}^0=2$  és  $\text{GH}^0=10$  keménységi fokú minták között. Az amoxicillin kevésbé volt stabil magasabb keménységi fokon, amely jelenséget a fémionoknak a  $\beta$ -laktámok bomlását katalizáló hatásával valószínűsíthetjük (Gunda 1999). Erre vonatkozó szakirodalmi adat azonban nem áll rendelkezésre. Hasonló különbség mutatkozott a  $\text{GH}^0=2$  és  $\text{GH}^0=6$  keménységű minták között, de mindez nem jelentkezett a  $\text{GH}^0=6$  és  $\text{GH}^0=10$  keménységi fokú minták összehasonlításakor. A feloldást követő 24 óra múlva  $84,9 \pm 2,3\%$ ,  $82,3 \pm 2,1\%$  és  $82,2 \pm 2,7\%$  volt rendre az intakt amoxicillin aránya a kezdeti 100%-hoz képest a 2, 6 és 10 német keménységi fokú ivóvízben. A referencia-készítménynél amoxicillin esetében nem találtunk szignifikáns eltérést a különböző fokú ivóvízmintákban megfigyelt bomlási sebességben. Ezen megfigyelés vélhetően bizonyos segédanyagok hozzáadásának következménye. A referencia-készítményben  $84,5 \pm 1,6\%$ -ra,  $83,0 \pm 3,3\%$ -ra és  $82,9 \pm 1,8\%$ -ra csökkent az amoxicillin koncentrációja rendre a 2-es, 6-os és 10-es keménységi fokú ivóvízmintákban 24 órát követően. A klavulánsav bomlási sebessége mindkét termékben szignifikáns különbséget mutatott  $\text{GH}^0=2$  és  $\text{GH}^0=6$  között, valamint  $\text{GH}^0=2$  és  $\text{GH}^0=10$  ( $p < 0,05$ ) között, magasabb keménységi fokon gyorsabbnak bizonyult a degradáció. Nem találtunk szignifikáns eltérést a klavulánsav bomlási sebességében  $\text{GH}^0=6$  és  $\text{GH}^0=10$  között egyik termékénél sem. Az „A” termékben  $71,6 \pm 2,9\%$ -a,  $67,5 \pm 1,2\%$ -a és  $66,7 \pm 1,9\%$ -a, a referenciában  $71,4 \pm 1,4\%$ -a,  $67,5 \pm 0,9\%$ -a és  $66,5 \pm 1,2\%$ -a maradt aktív 24 óra múlva rendre a 2-es, 6-os és 10-es keménységi fokok esetén. Az amoxicillin minden keménységi fokon stabilabbnak bizonyult a klavulánsavnál ( $p < 0,01$ ).

### 5.4.2. Vizsgálatok a pH függvényében

Az amoxicillin bomlási sebessége jelentős eltéréseket mutatott  $\text{pH}=3,0$  és  $\text{pH}=7,0$ ,  $\text{pH}=3,0$  és  $\text{pH}=10,0$ , valamint  $\text{pH}=7,0$  és  $\text{pH}=10,0$  közötti oldatokban, mindkét termékben ( $p < 0,05$ ). A feloldást követő 24 óra múlva  $79,6 \pm 2,6\%$ -a,  $72,4 \pm 3,1\%$ -a és  $68,2 \pm 3,1\%$ -a maradt aktív az amoxicillinnek 3,0-as, 7,0-es és 10,0-es pH-értékeknél. A referencia anyagnál ezek az értékek  $81,6 \pm 1,2\%$ ,  $70,6 \pm 3,3\%$  és  $67,8 \pm 1,8\%$  voltak. Az amoxicillin-trihidrát tehát a savas környezetben bizonyult a legstabilabbnak, a pH növelése kissé csökkentette stabilitását. Mind az „A”, mind a referencia-termékben a bomlás sebessége alkalikus közegben volt a legkifejezettebb. Ezt alátámasztják korábbi szakirodalmi adatok is (Sunderland és mtsai 1986, Vahdat és mtsai 2007, Zia és mtsai 1977), melyek szerint az amoxicillin stabilitásának maximuma pH 5,8 és 6,5 között található, valamint bomlékonyabb a semleges, mint a savas közegben. A klavulánsav mindhárom

vizsgált pH-értéken bomlékonyabb volt az amoxicillinnél, különösen a savas és bázikus közegben. A klavulánsav maximális stabilitását korábban pH=6,39-ben határozták meg (Bersanetti és mtsai 2005, Haginaka és mtsai 1981), melyet kísérletünk is alátámasztott; a hatóanyag bomlásának intenzitása jelentősen felgyorsult a savas és bázikus pH-tartományban a semlegeshez képest. A klavulánsav bomlásának sebessége szignifikáns eltérést mutatott pH=3,0 és pH=7,0; pH=3,0 és pH=10,0, valamint pH=7,0 és pH=10,0 között ( $p < 0,001$ ), a legjobb stabilitást semleges közegben mutatva. Nem találtunk jelentős eltérést a termék és a referencia között. A klavulánsavnak a feloldást követő 24 óra múlva  $0,3 \pm 0,15\%$ -a,  $41,4 \pm 3,4\%$ -a és  $11,7 \pm 1,2\%$ -a maradt intakt az „A” termékben a pH=3,0, 7,0 és 10,0 értékeken. A referencia-termékben ugyanezek az értékek  $0,3 \pm 0,08\%$ ,  $38,5 \pm 2,6\%$  és  $13,3 \pm 4,8\%$  voltak. A klavulánsav minden pH-értéken gyorsabban bomlott az amoxicillinnél ( $p < 0,001$ ).

#### 5.4.3. A hatóanyagok bomlása fém- és műanyag itatóedényben

Kísérleteink bebizonyították, hogy amoxicillin esetében a fémionok jelenléte az itatóedényben jelentősen növeli a hatóanyag bomlásának intenzitását. Szignifikáns különbségeket találtunk a fém és műanyag itatóedényben való feloldást követő bomlási sebességek között ( $p < 0,001$ ) amoxicillin esetében. A bomlás jelentősen felgyorsult mindkét termékben a fémionok jelenlétében. A feloldást követő 24. órában az „A” termékben az amoxicillin  $10,0 \pm 0,01\%$ -a maradt bomlatlanul a fémitatóban, míg  $83,3 \pm 1,3\%$ -a maradt aktív műanyag edényben. A referencia-termékben ezek az értékek  $42,7 \pm 0,2\%$  és  $84,9 \pm 2,9\%$  voltak a fém- és műanyag edényekben. Szignifikáns eltérés mutatkozott a két termék között ( $p < 0,05$ ) az amoxicillin bomlási sebességében a fémitatókban való feloldást követően, míg ez nem jelentkezett a műanyag edényekben való oldáskor. A referencia-termék itt is stabilabbnak bizonyult. A jelenség pontos magyarázata nem ismert, vélhetően segédanyagok hozzáadásával jelentősen lecsökkentették az amoxicillinnek a fémionok katalizáló hatására való érzékenységet. A klavulánsav bomlása is szignifikánsan lassabb volt a műanyag-, mint a fém itatóedényben ( $p < 0,001$ ). A műanyag edényben a klavulánsav bomlási sebessége meghaladta az amoxicillinét ( $p < 0,05$ ), ahogy azt fémionok hiányában várni lehetett. Ezzel szemben a fém itatókban a klavulánsav szignifikánsan stabilabbnak mutatkozott ( $p < 0,001$ ). Feltételezésünk alapján tehát a penicillinszármazékok érzékenyebbek a fémionok bomlást katalizáló hatására, mint más  $\beta$ -laktámok. A feloldás utáni 24. órában az „A” termékben a klavulánsav  $57,4 \pm 0,01\%$ -a maradt intakt a fém itatóedényben, míg  $72,0 \pm 1,8\%$ -a a műanyag edényben. A referenciatermékben ugyanezek az értékek  $57,7 \pm 1,6\%$  és  $73,6 \pm 3,3\%$  voltak rendre a fém- és a műanyag itatókban.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy mindhárom vizsgálati elrendezésben matematikailag és gyakorlati szempontból is jelentős különbségeket találtunk a hatóanyagok stabilitását illetően. A vízkeménység csupán enyhén befolyásolta a hatóanyagok bomlási sebességét, azonban mindkét hatóanyag stabilabb volt az alacsonyabb keménységi fokú ivóvízben. Az amoxicillin savas közegben volt a legstabilabb, a pH növelése jelentősen növelte bomlási sebességét. A klavulánsav bomlásának sebessége mindhárom vizsgált pH-értéken kifejezettebb volt az amoxicillinnél. Savas közegben a laktamáz-inhibitor kifejezett bomlásnak indult, ezért az itatóvíz savanyítása a kombináció ivóvízben való adagolásakor ellenjavallt. Megállapítottuk, hogy a kombináció stabilitása elsősorban a jóval bomlékonyabb klavulánsavtól függ. Az enzimgátló minden keménységi fokon (semleges pH-értéknél), mindhárom pH-értéknél (műanyag itatóban, semleges közegben) gyorsabban bomlott az amoxicillinnél. Fém itatóedényben azonban az amoxicillin bomlásának sebessége gyorsult fel jelentősen. A referencia-termék stabilabbnak bizonyult fémedényben, de ennek ellenére az amoxicillin-klavulánsav kombináció fém itatóedényben való alkalmazása nem javasolt. Ajánlásaink alapján a hatóanyagokat közel semleges kémhatású ivóvízben, műanyag itatóedényben kell feloldani, az ivóvíz savanyítása (pl. almaecettel) ellenjavallt. Ezen körülmények között mindkét hatóanyag koncentrációja a kezdeti koncentráció 90%-a körüli értéken, illetve e felett marad kb. 6 órán keresztül. Számítani kell továbbá arra, hogy kemény vízben a hatóanyagok bomlása kismértékben felgyorsul. A fenti okok miatt csökkenő antibiotikum-koncentráció ugyanis hatástalan vérplazma-koncentrációk kialakulásához, az antibakteriális terápia sikertelenségéhez vezethet, továbbá hozzájárul a bakteriális rezisztencia terjesztéséhez.

## 6. ZÁRÓ MEGBESZÉLÉS

Vizsgálat-sorozatunkban az amoxicillin-klavulánsav kombináció összehasonlító farmakokinetikai vizsgálatát végeztük el brojlercsirkében és pulykában, továbbá e két baromfifajból Magyarországon izolált *E. coli*, *P. multocida* és *S. enterica* törzsek érzékenységét vizsgáltuk amoxicillinre és az amoxicillin-klavulánsav kombinációra. Vizsgálatainkat a kombináció vízben való feloldását követő stabilitási vizsgálataival egészítettük ki.

Farmakokinetikai vizsgálataink ismeretében megállapíthatjuk, hogy a két hatóanyag között mindkét állatfajban találtunk matematikailag szignifikáns ( $p < 0,05$ ) eltéréseket, melyek azonban biológiailag nem jelentősek. Mivel a kombinációban az amoxicillin és a klavulánsav hatékony aránya 1:1 és 20:1 között mozog, a vérplazmában és a szövetekben ezt az arányt kell biztosítani, hogy laktamáz-termelő baktériumok ellen jó hatást tudjunk elérni. A hatóanyagok aránya a  $C_{max}$  szintjén a vérplazmában amoxicillin és klavulánsav tekintetében megközelítőleg 3:1 volt mindkét állatfajban. Az egyéb klinikailag is fontos farmakokinetikai paraméterek között – különös tekintettel a biológiai felezési időre és a virtuális megoszlási térfogatra – csupán kismértékű eltérések voltak tapasztalhatók, melynek következtében az arány a vérplazmában és a szövetekben többszöri alkalmazás esetén is fenntartható. Ez a jelenség hozzájárul mindkét baromfifajban az antibiotikum farmakokinetikai szempontból kedvező megítélésének. A két állatfaj farmakokinetikáját összehasonlítva szintén számos matematikailag szignifikáns, azonban klinikailag kevésbé jelentős különbséget tapasztalunk. A legfontosabb különbség mindkét hatóanyag biológiai hasznosulásában észlelhető: mind az amoxicillin, mind a klavulánsav szájon át való hasznosulása magasabb csirkében, mint pulykában ( $p < 0,05$ ). Ez a különbség azonban igen csekély, a kombináció esetleges jövőbeni alkalmazása esetén vélhetően dóziskorrekciót nem von maga után.

Baktérium-érzékenységi vizsgálataink eredményeit összefoglalva elmondható, hogy a vizsgált *E. coli* törzsek esetében elterjedt és nagyfokú rezisztenciát tapasztaltunk amoxicillinre és a klavulánsavval potenciált hatóanyagra is. Az amoxicillin-rezisztencia a törzsek egy részénél „áttörhető” a kombináció alkalmazásával, hiszen amoxicillin esetében a vizsgált törzsek 41,7%-a, míg a kombináció vizsgálatakor 64,1%-a bizonyult érzékenynek, a  $MIC_{90}$  értékek pedig  $>128$   $\mu\text{g/ml}$ -ről 32  $\mu\text{g/ml}$ -re csökkentek. Salmonellák és pasteurellák esetében az érzékenységi adatok kedvezőbbek, nem találtunk rezisztens törzset a kombinációra. Az amoxicillinre rezisztens törzsek  $MIC$ -értékei, illetve a rezisztens törzsek aránya kivétel nélkül jelentősen csökkentek az amoxicillin-klavulánsav kombináció alkalmazásakor, mely bakteriológiai és klinikai szempontból is felvetheti



az antibiotikumok együttes használatát házityúkban és pulykában, ha ezt a jövőbeni szabályozási körülmények lehetővé teszik.

Farmakokinetikai és érzékenységi vizsgálataink eredményeinek ismeretében lehetőségünk nyílik megállapításokat tenni a kombináció terápiás felhasználásáról. Tekintve, hogy a penicillinek időfüggő baktericid hatásmóddal rendelkező antibiotikumok, hatékonyságuk jellemzésére a  $T > MIC$ -érték (time-above- $MIC_{90}$ , vagyis az az időtartam, amíg a gyógyszer koncentrációja a vérben a legkisebb gátló koncentráció fölött van) javasolt. Ez a megkívánt időtartam baktériumonként változik, az *Enterobacteriaceae* család tagjainál, illetve egyéb Gram-negatív baktériumok esetén 60-80% között mozog (Gustaffson és mtsai. 2001., Macgowan és mtsai. 2004.). Amennyiben a  $T > MIC_{90}$  legalább 80%-a a két gyógyszerbeadás közt eltelt időnek (adagolási intervallum), az antibiotikum kellő hatékonyságúnak tekinthető vérfertőzést okozó *E. coli* ellen (Gustaffson és mtsai. 2001). Ez a feltételezés figyelembe veszi a többszöri adagolást követő magasabb plateau-koncentrációt ( $C_{pss}$ ), valamint az állat immunrendszerének élettani működését is. A fenti kívánalmak többszöri, bóluszokban történő adagolásra vonatkoznak, folyamatos, ivóvízzel való felvétel esetében csak korlátozottan alkalmazhatók.

Eredményeink alapján a leggyakoribb baromfipatógén kórokozók amoxicillin-klavulánsavval szembeni, amoxicillinre vonatkoztatott  $MIC_{90}$ -értékei 2  $\mu\text{g/ml}$  és 32  $\mu\text{g/ml}$  között változnak: *E. coli* esetében 32  $\mu\text{g/ml}$ , *P. multocida* esetében 4  $\mu\text{g/ml}$  és *S. enterica* esetében 2  $\mu\text{g/ml}$  lett a számított érték. Ismerve azt a tényt, hogy a klavulánsav az amoxicillinhez hasonló kinetikai paraméterekkel rendelkezik, és a hatékony arány a vérplazmában is fennmarad, az amoxicillin per os adását követő kinetikai görbék elemzése elegendő (l. 6. és 10. ábra). Feltételezzük továbbá, hogy a vízben való feloldást követően a klavulánsav bomlásának intenzitása nem haladja meg olyannyira az amoxicillinét, hogy a hatékony arány felboruljon. Stabilitási vizsgálataink alapján ez semleges pH-jú ivóvízben, műanyag itatóedényben legalább 6 óráig lehetséges. A fenti adatok figyelembe vételével elméletileg meghatározható, hogy a 12,5 mg/ttkg-os dózis alkalmazásakor biztosítható-e a hatékony plazmakoncentráció *E. coli*, *S. enterica*, ill. *P. multocida* okozta vérfertőzés esetén. Elmondhatjuk, hogy pasteurellák ( $MIC_{90}=4 \mu\text{g/ml}$ ) és salmonellák ( $MIC_{90}=2 \mu\text{g/ml}$ ) esetében a kombináció a vizsgált dózisban mérsékelt hatékonyságú, és a dózis növelése nélkül nem képes biztos hatást elérni ezen kórokozók által okozott vérfertőzésekben. *E. coli* ( $MIC_{90}=32 \mu\text{g/ml}$ ) okozta szisztémás fertőzésekben a gyógyszer szintén nem képes terápiás koncentrációt elérni a vérplazmában, csupán a bélbeli magasabb gyógyszer-koncentráció játszhat szerepet a baktériumok gyérítésében, és így a septicaemia megelőzésében. További megoldást jelenthet a dózis növelése is, mely magasabb  $C_{max}$  értékeket, így hosszabb  $T > MIC$  intervallumot biztosít. Így több, septicaemiát okozó *E. coli* törzs ellen is hatékonyvá válna a kombináció, bár az erre a fajra jellemző  $MIC_{90}$ -érték

(32 µg/ml) elérése csak jelentősen magasabb adaggal lenne elérhető, amely nem lenne gazdaságos. Pasteurellák és salmonellák esetében a dózis növelése jelentősen javíthatja a terápia sikerességét, hiszen így a  $C_{\max}$  emelkedésével egyre több törzs válna érzékennyé az antibiotikumra. Összességében elmondható tehát, hogy az amoxicillin-klavulánsav kombináció a 12,5 mg/ttkg-os dózisban nem javasolható a baromfi olyan, nagy gazdasági jelentőségű, baktérium okozta fertőzésében, mint az *E. coli*, salmonellák vagy pasteurellák okozta septicaemia.

## 7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Vizsgálat-sorozatunk elsődleges célja az amoxicillin-klavulánsav kombináció összehasonlító farmakokinetikájának leírása volt brojlercsirkében és pulykában. Meghatároztuk a két hatóanyag farmakokinetikai paramétereit intravénás és szájon át való alkalmazást követően, valamint az antibiotikumok per os biológiai hasznosulását mindkét baromfifajban. A szakirodalomban először közöltük az amoxicillin-klavulánsav kombináció per os biológiai hasznosulását pulykában és a klavulánsav per os hasznosulását brojlercsirkében. Megállapítottuk, hogy az aminopenicillin és a laktamáz-inhibitor farmakokinetikai viselkedése igen hasonló mind intravénás, mind per os alkalmazást követően mindkét állatfajban, amely a kombináció egyik fontos jellemzője. A két állatfajban kapott paraméterek összehasonlításakor matematikailag szignifikáns, de biológiailag, klinikailag nem jelentős a per os biológiai hasznosulásban való eltérés, mely magasabb volt brojlercsirkében, mint pulykában.

2. Kísérleteinkben meghatároztuk továbbá Magyarországon izolált, fontos baromfi-patogén baktériumok (*E. coli*, *S. enterica* és *P. multocida*) esetében az amoxicillinre és az amoxicillin-klavulánsav kombinációra az aktuális 50%-os és 90%-os minimális gátló-koncentráció-értékeket ( $MIC_{50}$  és  $MIC_{90}$ ), melyekről magyarországi szakirodalom nem áll rendelkezésre, sőt, nemzetközi szakirodalomban is csak elvétve található naprakész adat. Feltérképeztük az amoxicillinre, illetve a klavulánsavval potenciált hatóanyagra rezisztencia gyakoriságát a három, gazdaságilag legfontosabb baromfi-patogén kórokozóban, és megállapítottuk, hogy az amoxicillin-rezisztencia az esetek túlnyomó többségében „áttörhető” a kombináció alkalmazásával. Salmonellák és pasteurellák esetén a CLSI által előírt break-point értékek alapján nem találtunk rezisztens törzset az amoxicillin-klavulánsav kombinációra. Salmonellák ( $MIC_{90}=2 \mu\text{g/ml}$ ) és pasteurellák ( $MIC_{90}=4 \mu\text{g/ml}$ ) okozta szisztémás fertőzések esetében számításaink szerint a 12,5 mg/ttkg dózis nem elegendő a terápia sikerességéhez, bár a törzsek nagy része ellen a kombináció így is hatékony lehet. Az adag emelésével azonban biztos terápiás eredmény is elérhetővé válik a fenti baktériumok okozta kórképekben. *E. coli* ( $MIC_{90}=32 \mu\text{g/ml}$ ) okozta vérfertőzésekben a vérben a gyógyszer szintén nem képes terápiás koncentrációt elérni, ezt a dózis jelentős – de gazdaságos és biztonságos határokon belüli – emelésével sem lehet elérni. A bélbeli magasabb gyógyszer-koncentráció azonban kétségkívül szerepet játszhat a baktériumok számának csökkentésében, az immunválasz kialakulásának elősegítésében és a septicaemia megelőzésében az *Enterobacteriaceae* család két fenti tagjában.

3. Stabilitás-vizsgálataink során megállapítottuk, hogy különböző német keménységi fokú ivóvízben, különböző pH-értékeken, illetve műanyag és fém itatóedényben hogyan változik a kombinációs partnerek bomlékonysága. Tapasztalataink alapján kijelenthetjük, hogy a kombinációban a legtöbb esetben a klavulánsav bomlása jóval kifejezettebb. Ez igaz a különböző keménységi fokú ivóvízmintákban, a különböző pH-jú oldatokban és műanyag itatóedényben, ivóvízben is. Fém itatóedényben az amoxicillin bomlása jelentősen meghaladta az enzimgátló bomlási sebességét. Vizsgálatainkat összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az amoxicillin-klavulánsav kombináció alkalmazásakor a vízdékony porkészítmények feloldásához az elméletileg optimális közeg a lágy, közel semleges pH-jú ivóvíz, illetve a műanyag itatóedény. Ezen körülmények között a hatóanyagok koncentrációja 6 órán keresztül a kezdeti koncentráció-értékek 90%-a körüli, illetve e feletti értéken mérhető.

## 8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Abraham E.P., Chain E.: An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 146. 837. 1940.
2. Agerso H., Friis C.: Bioavailability of amoxicillin in pigs., *J. Vet. Pharm. Therap.* 21. 41-46. 1998.
3. Akaike, H.: A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*. 19. 716–723. 1974
4. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 289. 321–331. 1980
5. Anadón A., Martínez-Larrañaga M.R., Díaz M.J., Bringas P., Fernández M.C., Martínez M.A., Fernández-Cruz M.L.: Pharmacokinetics of amoxicillin in broiler chickens, *Avian Pathol*. 25. 449-458. 1996
6. Anfossi P., Zaghini A., Grassigli G., Menotta S., Fedrizzi G.: Relative oral bioavailability of microgranulated amoxicillin in pigs. *J. Vet. Pharm. Therap.* 25. 329-334. 2002.
7. Andrews J. M, Jevons G., Brenwald N. and Fraise A.: Susceptibility testing *Pasteurella multocida* by BSAC standardized methodology. *JAC*. 54. 962-964. 2004.
8. Bersanetti P.A., Almeida R.M.R.G., Barboza M., Araujo M.L.G, Hokka C.O.: Kinetic studies on clavulanic acid degradation. *Biochem. Eng. J.* 23. 31-36. 2005
9. Brinas L., Zarazag M., Saenz Y., Ruiz-Larrea F., Torres C.:  $\beta$ -lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans and healthy animals, *Antimicrob. Agents Chemother*. 46. 3156-3163. 2002.
10. Bush K., Jacoby G.A., Medeiros A.A.: A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother*. 39. 1211-1233. 1995.
11. Carceles C.M., Escudero E., Baggot J.D.: Comparative pharmacokinetics of amoxicillin / clavulanic acid combination after intravenous administration to sheep and goats. *J. Vet. Pharm. Therap.* 18. 132-136. 1995.
12. Carceles C.M., Escudero E., Vicente M.S., Serrano J.M, Carli S.: Pharmacokinetics of amoxicillin/clavulanic acid combination after intravenous and oral administration in goats. *Vet Quart*. 17. 134-138. 1995
13. Carceles C.M., Vicente M.S., Escudero E.: Pharmacokinetics of amoxicillin-clavulanic acid combination after intravenous and intramuscular administration to turkeys and chickens, *Avian Pathol*. 24. p. 643-652. 1995

14. Caroff N., Espaze E., Berard I., Richet H., Reynaud A.: Mutations in the ampC promoter of *Escherichia coli* isolates resistant to oxyiminocephalosporins without extended spectrum beta-lactamase production. *FEMS Microbiol Letters*, 173. 459-465. 1999.
15. Committee of Laboratory Standards Institute (CLSI): Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Seventh Edition; Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement, M07-A7, 2008.
16. Constable P.D.: Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhea. *J Vet Intern Med.* 18. 2004.
17. DANMAP 2005 - Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. 2005.
18. Dargatz D., Fedorka-Cray P., Ladely S., Ferris K., Green A., Headrick M.: Antimicrobial susceptibility patterns of *Salmonella* isolates from cattle in feedlots. *JAVMA.* 221. 2002.
19. Datta N., Kontomichalou P.: Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature.* 208. 239-244. 1965
20. El-Sooud K.A., Al-Tarazi Y.H., Al-Bataineh M.M.: Comparative pharmacokinetics and bioavailability of amoxicillin in chickens after intravenous, intramuscular and oral administrations. *Veterinary Research Communications.* 28. 599-607. 2004
21. Ensink J.M., Klein W.R, Mevius D.J., Klarenbeek A., Vulto A.G.: Bioavailability of oral penicillins in the horse: a comparison of pivampicillin and amoxicillin. *J. Vet. Pharm. Therap.* 15. 221-230. 1992.
22. Finn M.J. – Harris M.A.– Hunt E. – Zomaya I.: Studies on the hydrolysis of Clavulanic Acid. Beecham Research, Betchworth, Surrey RH37AJ. 1345-1348. 1984.
23. Giguere S., Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D., Dowling P.M. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine 4th Edition.. Blackwell Publishing. Iowa. 2006.
24. Graziani C., Busani L., Dionisi A.M., Lucarelli C., Owczarek S., Ricci A., Mancin M., Caprioli A., Luzzi I.: Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from human and animal sources in Italy. *Vet. Microbiol.* 414-418. 2008.
25. Gunda Tamás: A kémia újabb eredményei 84. kötet (Penicillinek, kefalosporinok és egyéb  $\beta$ -laktám antibiotikumok). Akadémiai Kiadó. Budapest. 1999.
26. Gustafsson I., Löwdin E., Odenholt I., and Cars O.: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Parameters for Antimicrobial Effects of Cefotaxime and Amoxicillin in an In Vitro Kinetic Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45. 2436-2440. 2001.

27. Haginaka, Jun - Nakagawa, Terumichi - Uno, Toyozo: Stability of Clavulanic acid in aqueous solutions. *Chem.Pharm.Bull.* 29. 3334-3341. 1981.
28. Hautekeete M., Horsmans Y., van Waeyenberge C., Demanet C., Henrion J., Verbist L., Brenard R., Sempoux C., Michielsen P., Yap P., Rahier J., Geubel A.: HLA Association of Amoxicillin-Clavulanate-Induced Hepatitis. *Gastroenterology.* 117. 1181-1186. 1999.
29. Hoizey, G., Lamiable, D., Frances, C., Trenque, T., Kaltenbach, M., Denis, J., Millart, H. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC with UV detection. *J Pharm Biomed Anal.* 30. 661-666. 2002.
30. Kaszanyitzky É., Jánosi Sz., Egyed Zs., Ágost G., Semjén G.: Antibiotic resistance of staphylococci from humans, food and different animal species according to data of the hungarian resistance monitoring system in 2001. *Acta Vet Hung.* 51. 451-464. 2003
31. Kim S., Lee Y., Jyeong J., Kim S.: Biochemical properties and antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from pneumonic lungs in slaughtered animals. *Korean J Vet Serv.* 22. 79-84. 1999.
32. Küng K., Wanner M.: Bioavailability of different forms of amoxycillin administered orally to dogs. *Vet Rec.* 135. 552-554. 1994.
33. Lion C., Conroy M., Carpentier A., Lozniewski A.: Antimicrobial susceptibilities of *Pasteurella* strains isolated from humans. *Int J Antimicrob Agents.* 27. 290-293. 2006.
34. Macgowan A.P, Noel A.R., Rogers A.C., Bowker K.E.: Antibacterial Effects of Amoxicillin-Clavulanate against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* Strains for Which MICs Are High, in an In Vitro Pharmacokinetic Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48. 2599-2603. 2004.
35. Montesissa C., Carli S., Sonzogni O., Garlappi R.: Pharmacokinetics of sodium amoxicillin in horses. *Res Vet Sci.* 44. 233-236. 1988.
36. Naas T., Benaoudia F. Lebrun L., Nordmann P.: Molecular Identification of TEM-1  $\beta$ -Lactamase in a *Pasteurella multocida* Isolate of Human Origin. *Eur J Clin Microbiol.* 20. 210-213. 2001.
37. Parveen S. Taabodi M. Schwarz JG. Oscar TP. Harter-Dennis J. White DG. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella recovered from processed poultry. *J Food Protect.* 70. 2466-72. 2007.
38. Pedersen K., Jensen H., Finster K. Jensen VF, Heuer OE.: Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs. *J. Antimicrob Chemother.* 60. 775-781. 2007.

39. Perner J., Winter P., Baumgartner W.: Retrospective study using Synulox<sup>®</sup> in mastitis therapy. *Tierärztliche Praxis*. 30. 2002.
40. Reyns T., De Boever S., Baert K., Croubels S., Schauvliege S., Gasthuys F., De Backer P. Disposition and oral bioavailability of amoxicillin and clavulanic acid in pigs. *J Vet Pharmacol Therap*. 30. 550-555. 2007.
41. Richmond MH, Sykes RB.: The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv. Microb. Physiol*. 9. 31-88. 1973.
42. Rosenau A, Labigne A, Escande F, Courcoux P, and Philippon A.: Plasmid-mediated ROB-1 beta-lactamase in *Pasteurella multocida* from a human specimen. *Antimicrob Agents Chemother*. 35. 2419–2422. 1991.
43. Roubos, Johannes A. - Krabben, Preben - de Laat, Wim T.A.M - Babuska, Robert - Heijnen, Joseph J.: Clavulanic acid degradation in *Streptomyces clavuligerus* Fed-Batch Cultivations. *Biotechnol Progr*. 18. 451-457. 2002.
44. Schwarz. G.: Estimating the dimension of a model. *Ann Stat*. 6. 461-464. 1978.
45. Siemon C. E., Siemon CE. Bahnson PB. Gebreyes WA.: Comparative investigation of prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella between pasture and conventionally reared poultry. *Avian Dis*. 51. 112-117. 2007
46. Soback S, Bor A, Kurtz B, Paz R, Ziv G. Clavulanate-potentiated amoxycillin: in vitro antibacterial activity and oral bioavailability in calves. *J Vet Pharmacol Therap*. 10. 105-13. 1987
47. Stapleton P., Wu P., King A., Shannon K., French G., Phillips I.: Incidence and mechanisms of resistance of the combination of amoxicillin and clavulanic acid in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents and Chemother*. 39. 2478-2483. 1995.
48. Sunderland, VB - Concannon, J – Lovitt, H – Ramage, M - Tai LH – McDonald, C : Stability of aqueous solutions of amoxicillin sodium in the frozen and liquid states. *Am J Hosp Pharm*. 43. 3027-30. 1986.
49. Thi Thu Hao Van, James Chin, Toni Chapman, Linh Thuoc Tran, Peter J. Coloe: Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: An analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes, *Int. J. Food Microbiol*. 124. 217-223. 2008.
50. Vahdat L., Sunderland V.B.: Kinetics of amoxicillin and clavulanate degradation alone and in combination in aqueous solution under frozen conditions. *Int J Pharm*. 342. 95-104. 2007
51. Winokur P.L., Vonstein D. L., Hoffman L.J., Uhlenhopp E. K., Doern G.V.: Evidence for transfer of CMY-2 AmpC beta-lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella*



- isolates from food animals and humans. *Antimicrob Agents and Chemother.* 45. 2716-2722. 2001.
52. Witkowski G., Lode H., Hoffken G., Koeppe P.: Pharmacokinetics of amoxicillin, potassium clavulanate and their combination. *Eur J Clin Microbiol.* 1. 1982.
53. Xian-Zhi Li, Manisha M., Shiva G., Adewoye L.:  $\beta$ -Lactam resistance and  $\beta$ -lactamases in bacteria of animal origin, *Vet Microbiol.*, 121. 197-214. 2007.
54. Zia H., Shalchian N., Borhanian F.. Kinetics of amoxycillin degradation in aqueous solutions. *Can J. Pharm Sci.* 12 80-83. 1977.

## 9. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK

Jerzsele Á., Semjén G.: Az amoxicillin-klavulánsav kombináció használata az állatgyógyászatban. Irodalmi összefoglaló. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 2006. 7. 419-426.

A. Jerzsele, G. Nagy, J. Lehel, G. Semjen: Oral bioavailability and pharmacokinetic profile of the amoxicillin-clavulanic acid combination after intravenous and oral administration in broiler chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2009. *Accepted for publication*

A. Jerzsele, G. Nagy: The stability of veterinary amoxicillin trihydrate and potassium clavulanate combinations in aqueous solutions. *Acta Veterinaria Hungarica*. 2009. *Accepted for publication*

## 10. FÜGGELÉK

1. táblázat: Validálási eredmények amoxicillin esetében a farmakokinetikai kísérletben (brojlercsirke)

Elméleti konc. (µg/ml)	Meghatározások						Visszanyerés (%)			Pontosság (%)
	1	2	3	4	5	6	Átlag	Szórás	CV (%)	
2	1,84	2,06	1,88	1,82	1,94	2,12	97,17	±6,11	6,29	-2,83
5	4,89	4,98	4,77	4,99	5,11	4,96	99,00	±2,27	2,29	-1,00
10	9,73	9,98	10,24	10,1	9,88	9,74	99,45	±2,02	2,03	-0,55

2. táblázat: Validálási eredmények klavulánsav esetében a farmakokinetikai kísérletben (brojlercsirke)

Elméleti konc. (µg/ml)	Meghatározások						Visszanyerés (%)			Pontosság (%)
	1	2	3	4	5	6	Átlag	Szórás	CV (%)	
2	1,92	1,96	1,89	2,12	2,1	1,95	99,50	±4,82	4,84	-0,50
5	4,94	5,07	4,79	5,03	5,01	4,85	98,97	±2,19	2,22	-1,03
10	9,69	10,1	10,26	10,07	9,78	9,86	99,60	±2,18	2,19	-0,40

3. táblázat: Validálási eredmények amoxicillin esetében a farmakokinetikai kísérletben (pulyka)

Elméleti konc. (µg/ml)	Meghatározások						Visszanyerés (%)			Pontosság (%)
	1	2	3	4	5	6	Átlag	Szórás	CV (%)	
2	2,11	1,99	1,82	1,87	1,96	1,94	97,42	±5,03	5,17	-2,58
5	5,1	5,03	4,87	4,65	5,05	4,93	98,77	±3,28	3,33	-1,23
10	9,78	9,84	10,1	9,86	10,13	9,84	99,25	±1,50	1,51	-0,75

4. táblázat: Validálási eredmények klavulánsav esetében a farmakokinetikai kísérletben (pulyka)

Elméleti konc. (µg/ml)	Meghatározások						Visszanyerés (%)			Pontosság (%)
	1	2	3	4	5	6	Átlag	Szórás	CV (%)	
2	1,95	1,82	1,78	2,11	2,03	1,92	96,75	±6,22	6,43	-3,25
5	5,12	5,01	4,79	4,83	4,92	5,0	98,90	±2,46	2,49	-1,10
10	9,69	9,82	9,89	10,07	10,03	9,91	99,02	±1,39	1,40	-0,98

5. táblázat: A validálás visszanyerési eredményei amoxicillin esetében a stabilitási vizsgálatban

Elméleti Konc. (mg/ml)	Visszanyerés (%)			Átlag ± SD (%)	CV %
	Meghatározások				
	1	2	3		
0,7	94,3	102,9	97,1	98,1±4,4	4,5
1,4	105,7	102,1	95,7	101,2±5,1	5,0
2,8	95,4	101,8	99,3	98,8±3,2	3,3

6. táblázat: A validálás visszanyerési eredményei klavulánsav esetében a stabilitási vizsgálatban

Elméleti Konc. (mg/ml)	Visszanyerés (%)			Átlag ± SD (%)	CV %
	Meghatározások				
	1	2	3		
0,175	94,3	102,3	98,9	98,5±4,0	4,1
0,350	103,1	98,9	95,4	99,1±3,9	3,9
0,700	99,1	96,0	102,7	99,3±3,4	3,4

7. táblázat: A validálás ismételtetésre és pontosságra vonatkozó eredményei amoxicillin esetében a stabilitási vizsgálatban

Elméleti konc. (mg/ml)	Mért koncentráció (mg/ml)			Átlag ± SD (mg/ml)	CV %	Pont. (%)
	Meghatározások					
	1	2	3			
0,7	0,66	0,72	0,68	0,69±0,03	4,5	-1,4
1,4	1,48	1,43	1,34	1,42±0,07	5,0	+1,4
2,8	2,67	2,85	2,78	2,77±0,09	3,3	-1,1

8. táblázat: A validálás ismételtetésre és pontosságra vonatkozó eredményei klavulánsav esetében a stabilitási vizsgálatban

Elméleti konc. (mg/ml)	Mért koncentráció (mg/ml)			Átlag ± SD (mg/ml)	CV %	Pont. (%)
	Meghatározások					
	1	2	3			
0,175	0,165	0,179	0,173	0,172±0,007	4,1	-1,7
0,350	0,361	0,346	0,334	0,347±0,014	3,9	-0,9
0,700	0,694	0,672	0,719	0,695±0,024	3,4	-0,7

**9. Táblázat: az amoxicillin mért plazmakoncentrációi brojlercsirkében a crossover vizsgálat két periódusában az amoxicillin-klavulánsav kombináció intravénás (10 mg/ttkg amoxicillin, 2.5 mg/ttkg klavulánsav) beadását követően**

<b>Intravénás beadás - amoxicillin - brojlercsirke</b>						
	<b>1. Állat</b>	<b>2. Állat</b>	<b>3. Állat</b>	<b>4. Állat</b>	<b>5. Állat</b>	<b>6. Állat</b>
<b>Idő (perc)</b>	<b>Plazmakonc. (µg/ml)</b>					
<b>5</b>	26,6	32,28	29,96	27,89	31,3	32,4
<b>10</b>	17,98	18,42	17,95	17,97	17,8	18,99
<b>20</b>	7,06	6,25	7,75	6,45	7,92	7,95
<b>30</b>	4,28	4,57	4,75	4,05	5,44	4,36
<b>45</b>	3,13	2,74	3,21	2,63	3,44	2,86
<b>60</b>	1,68	1,72	1,86	1,65	1,79	1,64
<b>90</b>	1,22	1,4	1,51	1,22	1,37	1,31
<b>120</b>	0,96	1,09	1,12	0,97	0,99	0,99
<b>240</b>	0,29	0,38	0,4	0,37	0,28	0,34
<b>300</b>	0,2	0,23	0,21	0,25	0,2	0,25
<b>360</b>	-	0,18	0,16	-	0,16	0,17
<b>Crossover 2. fázis plazmakoncentrációk (µg/ml)</b>						
<b>5</b>	25,14	33,41	28,91	28,48	26,91	35,15
<b>10</b>	18,88	18,79	19,75	17,88	16,73	19,84
<b>20</b>	7,20	6,28	7,17	6,42	8,00	7,83
<b>30</b>	3,87	4,96	4,70	3,89	5,88	4,53
<b>45</b>	2,93	2,78	3,08	2,87	3,47	2,80
<b>60</b>	1,71	1,81	1,79	1,67	1,70	1,66
<b>90</b>	1,36	1,22	1,27	1,19	1,33	1,42
<b>120</b>	0,94	1,11	1,19	0,89	1,04	0,95
<b>240</b>	0,27	0,38	0,41	0,35	0,27	0,35
<b>300</b>	0,19	0,24	0,24	0,23	0,20	0,23
<b>360</b>	-	0,16	0,19	0,18	-	0,19

**10. Táblázat: az amoxicillin mért plazmakoncentrációi brojlercsirkében a crossover vizsgálat két periódusában az amoxicillin-klavulánsav kombináció per os (10 mg/ttkg amoxicillin, 2,5 mg/ttkg klavulánsav) beadását követően**

<b>Per os beadás - amoxicillin - brojlercsirke</b>						
	<b>1. Állat</b>	<b>2. Állat</b>	<b>3. Állat</b>	<b>4. Állat</b>	<b>5. Állat</b>	<b>6. Állat</b>
<b>Idő (perc)</b>	<b>Plazmakonc. (µg/ml)</b>					
<b>5</b>	1,39	1,31	1,27	1,37	1,22	1,44
<b>10</b>	2,49	2,27	2,47	2,37	2,49	2,45
<b>20</b>	3,67	3,26	3,48	3,16	3,27	3,36
<b>30</b>	4,88	4,07	4,12	3,92	3,89	3,97
<b>45</b>	3,43	3,43	3,62	3,43	3,62	3,27
<b>60</b>	2,81	2,73	2,73	2,59	2,68	2,8
<b>90</b>	2,27	2,32	2,16	2,35	2,14	2,12
<b>120</b>	1,72	1,64	1,6	1,48	1,51	1,64
<b>240</b>	0,56	0,52	0,62	0,57	0,64	0,68
<b>300</b>	0,37	0,31	0,32	0,36	0,39	0,3
<b>360</b>	0,2	0,17	0,18	0,19	0,16	0,22
<b>480</b>	0,16	-	-	0,17	-	0,16
<b>Crossover 2. fázis plazmakoncentrációk (µg/ml)</b>						
<b>5</b>	1,46	1,32	1,26	1,32	1,23	1,51
<b>10</b>	2,73	2,47	2,59	2,33	2,47	2,27
<b>20</b>	3,91	3,19	3,41	3,16	3,11	3,12
<b>30</b>	5,34	4,21	3,89	3,78	3,89	4,29
<b>45</b>	3,29	3,29	3,66	3,45	3,69	3,14
<b>60</b>	2,66	2,57	2,73	2,69	2,48	2,79
<b>90</b>	2,21	2,13	2,41	2,27	2,10	2,45
<b>120</b>	1,73	1,62	1,68	1,53	1,38	1,57
<b>240</b>	0,56	0,62	0,55	0,58	0,63	0,69
<b>300</b>	0,58	0,50	0,52	0,45	0,50	0,63
<b>360</b>	0,19	0,17	0,18	0,18	0,16	0,23
<b>480</b>	-	-	-	0,16	-	0,17

**11. Táblázat: a klavulánsav mért plazmakoncentrációi brojlercsirkében a crossover vizsgálat két periódusában az amoxicillin-klavulánsav kombináció intravénás (10 mg/ttkg amoxicillin, 2,5 mg/ttkg klavulánsav) beadását követően**

<b>Intravénás beadás - klavulánsav - brojlercsirke</b>						
	<b>1. Állat</b>	<b>2. Állat</b>	<b>3. Állat</b>	<b>4. Állat</b>	<b>5. Állat</b>	<b>6. Állat</b>
<b>Idő (perc)</b>	<b>Plazmakonc. (µg/ml)</b>					
<b>5</b>	8,83	7,13	6,98	8,77	7,57	8,22
<b>10</b>	5,82	4,87	4,82	4,79	5,58	4,93
<b>20</b>	2,45	2,26	2,31	2,47	2,28	2,09
<b>30</b>	1,18	1,37	1,27	1,23	1,34	1,29
<b>45</b>	0,82	0,87	0,88	0,74	0,84	0,76
<b>60</b>	0,6	0,59	0,57	0,49	0,57	0,52
<b>90</b>	0,42	0,37	0,44	0,45	0,49	0,44
<b>120</b>	0,34	0,32	0,36	0,27	0,31	0,27
<b>180</b>	0,21	0,19	0,2	0,16	0,18	0,16
<b>240</b>	-	-	-	0,09	0,1	0,09
<b>Crossover 2. fázis plazmakoncentrációk (µg/ml)</b>						
<b>5</b>	8,74	7,06	7,15	9,56	7,31	8,71
<b>10</b>	5,56	4,94	5,01	4,50	5,44	4,98
<b>20</b>	2,54	2,29	2,51	2,59	2,28	2,09
<b>30</b>	1,12	1,30	1,34	1,17	1,39	1,32
<b>45</b>	0,78	0,84	0,88	0,77	0,88	0,76
<b>60</b>	0,65	0,63	0,57	0,47	0,56	0,51
<b>90</b>	0,48	0,43	0,37	0,32	0,40	0,38
<b>120</b>	0,35	0,33	0,38	0,25	0,28	0,27
<b>180</b>	0,20	0,19	0,21	0,16	0,19	0,15
<b>240</b>	0,13	-	0,10	-	0,11	-

**12. Táblázat: a klavulánsav mért plazmakoncentrációi brojlercsirkében a crossover vizsgálat két periódusában az amoxicillin-klavulánsav kombináció per os (10 mg/ttkg amoxicillin, 2,5 mg/ttkg klavulánsav) beadását követően**

<b>Per os beadás - klavulánsav - brojlercsirke</b>						
	<b>1. Állat</b>	<b>2. Állat</b>	<b>3. Állat</b>	<b>4. Állat</b>	<b>5. Állat</b>	<b>6. Állat</b>
<b>Idő (perc)</b>	<b>Plazmakonc. (µg/ml)</b>					
<b>5</b>	0,37	0,28	0,42	0,39	0,37	0,37
<b>10</b>	0,81	0,79	0,97	0,68	0,7	0,84
<b>20</b>	1,12	1,23	1,14	1,02	1,01	1,07
<b>30</b>	1,26	1,62	1,36	1,17	1,33	1,29
<b>45</b>	1,07	1,11	1,07	1,11	1,17	1,2
<b>60</b>	0,82	0,82	0,85	0,86	0,75	0,82
<b>90</b>	0,66	0,63	0,67	0,69	0,61	0,6
<b>120</b>	0,38	0,4	0,44	0,46	0,38	0,39
<b>180</b>	0,23	0,2	0,24	0,22	0,21	0,17
<b>240</b>	0,17	0,15	0,14	0,16	0,17	0,15
<b>360</b>	0,08	-	-	0,11	0,12	-
<b>Crossover 2. fázis plazmakoncentrációk (µg/ml)</b>						
<b>5</b>	0,36	0,33	0,37	0,32	0,39	0,32
<b>10</b>	0,79	0,82	0,87	0,66	0,72	0,91
<b>20</b>	1,08	1,29	1,20	1,03	0,96	1,06
<b>30</b>	1,42	1,67	1,47	1,26	1,50	1,31
<b>45</b>	1,08	1,00	0,95	1,13	1,28	1,22
<b>60</b>	0,82	0,94	0,82	0,93	0,73	0,89
<b>90</b>	0,62	0,67	0,60	0,69	0,55	0,71
<b>120</b>	0,40	0,43	0,51	0,42	0,36	0,39
<b>180</b>	0,22	0,21	0,23	0,20	0,21	0,24
<b>240</b>	0,17	0,13	0,15	0,15	0,17	0,15
<b>360</b>	0,12	0,09	0,11	-	0,12	-



**13. Táblázat: az amoxicillin mért plazmakoncentrációi pulykában a crossover vizsgálat két periódusában az amoxicillin-klavulánsav kombináció intravénás (10 mg/ttkg amoxicillin, 2,5 mg/ttkg klavulánsav) beadását követően**

<b>Intravénás beadás - amoxicillin - pulyka</b>						
	<b>1. Állat</b>	<b>2. Állat</b>	<b>3. Állat</b>	<b>4. Állat</b>	<b>5. Állat</b>	<b>6. Állat</b>
<b>Idő (perc)</b>	<b>Plazmakonc. (µg/ml)</b>					
<b>5</b>	30,4	31,28	33,96	32,89	32,21	32,4
<b>10</b>	17,98	18,28	17,85	17,97	16,83	18,99
<b>20</b>	7,11	7,08	7,14	6,32	7,92	7,95
<b>30</b>	4,75	4,37	4,48	3,74	4,57	4,36
<b>45</b>	3,96	2,74	3,22	2,53	3,22	2,86
<b>60</b>	2,73	2,17	1,86	1,65	1,67	1,64
<b>90</b>	1,65	1,45	1,32	1,23	1,29	1,23
<b>120</b>	1,04	1,09	1,21	0,97	0,99	1,1
<b>150</b>	0,63	0,62	0,77	0,71	0,74	0,68
<b>240</b>	0,41	0,38	0,36	0,33	0,28	0,33
<b>360</b>	0,14	-	0,13	-	-	0,15
<b>Crossover 2. fázis plazmakoncentrációk (µg/ml)</b>						
<b>5</b>	31,62	31,12	36,51	33,88	30,28	30,94
<b>10</b>	17,62	19,65	17,58	18,15	17,00	18,33
<b>20</b>	7,50	7,29	7,46	6,73	7,44	7,75
<b>30</b>	4,89	4,15	4,41	3,59	4,20	4,60
<b>45</b>	3,64	2,52	3,43	2,66	3,08	2,97
<b>60</b>	2,76	2,27	1,96	1,62	1,54	1,63
<b>90</b>	1,49	1,36	1,41	1,26	1,37	1,16
<b>120</b>	0,91	1,04	1,23	0,96	1,02	1,15
<b>150</b>	0,65	0,58	0,72	0,71	0,82	0,69
<b>240</b>	0,38	0,37	0,33	0,31	0,31	0,36
<b>360</b>	0,15	0,14	0,14	-	-	1,13

14. Táblázat: az amoxicillin mért plazmakoncentrációi pulykában a crossover vizsgálat két periódusában az amoxicillin-klavulánsav kombináció per os (10 mg/ttkg amoxicillin, 2,5 mg/ttkg klavulánsav) beadását követően

<b>Per os beadás - amoxicillin - pulyka</b>						
	<b>1. Állat</b>	<b>2. Állat</b>	<b>3. Állat</b>	<b>4. Állat</b>	<b>5. Állat</b>	<b>6. Állat</b>
<b>Idő (perc)</b>	<b>Plazmakonc. (µg/ml)</b>					
<b>5</b>	1,39	1,31	1,24	1,37	1,31	1,33
<b>10</b>	2,49	2,37	2,61	2,37	2,2	2,39
<b>20</b>	3,35	3,34	3,52	3,15	3,11	3,17
<b>30</b>	4,54	4,13	4,48	4,02	3,87	4,23
<b>45</b>	3,47	3,39	3,65	3,75	3,33	3,65
<b>60</b>	2,81	2,56	2,74	2,92	2,65	2,93
<b>90</b>	2,06	1,87	1,68	2,01	2,01	2,08
<b>120</b>	1,58	1,48	1,37	1,48	1,48	1,5
<b>150</b>	1,1	0,97	0,92	0,92	0,92	0,97
<b>240</b>	0,57	0,51	0,52	0,5	0,5	0,52
<b>360</b>	0,2	0,17	0,18	0,19	0,19	0,22
<b>420</b>	0,13	-	-	0,14	0,15	0,14
<b>Crossover 2. fázis plazmakoncentrációk (µg/ml)</b>						
<b>5</b>	1,37	1,32	1,27	1,40	1,40	1,40
<b>10</b>	2,43	2,18	2,39	2,38	2,32	2,27
<b>20</b>	3,27	3,16	3,48	3,07	3,13	3,17
<b>30</b>	4,40	3,84	4,59	4,16	3,95	4,02
<b>45</b>	3,28	3,36	3,76	3,58	2,96	3,65
<b>60</b>	2,75	2,57	2,73	2,73	2,64	2,81
<b>90</b>	2,04	1,91	1,73	1,94	1,98	2,14
<b>120</b>	1,56	1,47	1,35	1,47	1,46	1,59
<b>150</b>	1,02	0,98	0,88	0,92	0,86	0,88
<b>240</b>	0,63	0,50	0,51	0,46	0,53	0,52
<b>360</b>	0,22	0,17	0,18	0,18	0,19	0,23
<b>420</b>	0,13	-	-	1,13	1,14	0,16

15. Táblázat: a klavulánsav mért plazmakoncentrációi pulykában a crossover vizsgálat két periódusában az amoxicillin-klavulánsav kombináció intravénás (10 mg/ttkg amoxicillin, 2,5 mg/ttkg klavulánsav) beadását követően

<b>Intravénás beadás - klavulánsav - pulyka</b>						
	<b>1. Állat</b>	<b>2. Állat</b>	<b>3. Állat</b>	<b>4. Állat</b>	<b>5. Állat</b>	<b>6. Állat</b>
<b>Idő (perc)</b>	<b>Plazmakonc. (µg/ml)</b>					
<b>5</b>	9,12	8,23	8,96	8,92	8,23	8,82
<b>10</b>	5,63	5,12	5,62	5,87	5,61	5,33
<b>20</b>	2,34	2,57	2,47	3,02	2,61	2,23
<b>30</b>	1,49	1,52	1,53	2,16	1,47	1,42
<b>45</b>	0,91	1,07	0,96	1,1	0,99	0,84
<b>60</b>	0,68	0,68	0,75	0,72	0,64	0,61
<b>90</b>	0,55	0,52	0,57	0,51	0,51	0,49
<b>120</b>	0,36	0,4	0,39	0,37	0,37	0,31
<b>150</b>	0,28	0,27	0,32	0,28	0,26	0,24
<b>180</b>	0,23	0,19	0,24	0,23	0,18	0,2
<b>240</b>	0,1	0,12	0,11	0,14	0,11	0,11
<b>Crossover 2. fázis plazmakoncentrációk (µg/ml)</b>						
<b>5</b>	8,16	8,76	8,42	8,56	8,27	9,08
<b>10</b>	5,94	4,94	6,04	6,02	5,36	5,44
<b>20</b>	2,45	2,58	2,40	3,17	2,39	2,15
<b>30</b>	1,50	1,59	1,51	2,12	1,48	1,31
<b>45</b>	0,86	1,11	0,97	1,23	0,99	0,92
<b>60</b>	0,69	0,65	0,71	0,67	0,66	0,65
<b>90</b>	0,61	0,53	0,54	0,50	0,54	0,47
<b>120</b>	0,38	0,37	0,43	0,38	0,33	0,29
<b>150</b>	0,25	0,26	0,31	0,29	0,27	0,26
<b>180</b>	0,23	0,20	0,25	0,24	0,19	0,21
<b>240</b>	0,10	0,12	0,11	0,13	0,11	0,10

16. Táblázat: a klavulánsav mért plazmakoncentrációi pulykában a crossover vizsgálat két periódusában az amoxicillin-klavulánsav kombináció per os (10 mg/ttkg amoxicillin, 2,5 mg/ttkg klavulánsav) beadását követően

Per os beadás - klavulánsav - pulyka						
	1. Állat	2. Állat	3. Állat	4. Állat	5. Állat	6. Állat
Idő (perc)	Plazmakonc. (µg/ml)					
5	0,35	0,42	0,35	0,49	0,37	0,46
10	0,88	0,87	0,82	1,12	0,7	0,87
20	1,11	1,3	1,12	1,46	1,01	1,21
30	1,26	1,62	1,31	1,67	1,33	1,52
45	1,04	1,24	1,02	1,3	1,17	1,08
60	0,85	0,92	0,76	1,15	0,75	0,9
90	0,68	0,65	0,57	0,78	0,65	0,72
120	0,44	0,4	0,36	0,44	0,4	0,49
150	0,33	0,32	0,28	0,33	0,32	0,36
240	0,17	0,17	0,15	0,17	0,17	0,19
360	0,08	-	-	-	-	0,09
Crossover 2. fázis plazmakoncentrációk (µg/ml)						
5	0,35	0,43	0,33	0,53	0,39	0,48
10	0,84	0,96	0,86	1,23	0,75	0,89
20	1,19	1,43	1,07	1,60	1,08	1,34
30	1,28	1,63	1,36	1,71	1,36	1,57
45	1,10	1,16	1,11	1,28	1,16	1,16
60	0,82	0,96	0,71	1,23	0,74	0,94
90	0,64	0,71	0,58	0,77	0,73	0,78
120	0,44	0,42	0,35	0,48	0,41	0,50
150	0,34	0,32	0,31	0,37	0,33	0,39
240	0,18	0,18	0,15	0,17	0,18	0,20
360	0,08	-	-	0,08	-	0,09





Sorszám	Faj	Állatfaj	Szerv	Kontroll	Amoxicillin (µg/ml)									
					128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	
86	<i>E.coli</i>	csirke	M	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
87	<i>E.coli</i>	pulyka	csv	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
88	<i>E.coli</i>	pulyka	csv	+++	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++
89	<i>E.coli</i>	pulyka	csv	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++
90	<i>E.coli</i>	pulyka	csv	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
91	<i>E.coli</i>	pulyka	csv	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
92	<i>E.coli</i>	pulyka	máj	+++	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++
93	<i>E.coli</i>	pulyka	máj	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
94	<i>E.coli</i>	pulyka	máj	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
95	<i>E.coli</i>	csibe	csv	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++
96	<i>E.coli</i>	pulyka	csv	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
97	<i>E.coli</i>	pulyka	csv	+++	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++
98	<i>E.coli</i>	csibe	csv	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
99	<i>E.coli</i>	pulyka	csv	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
100	<i>E.coli</i>	pulyka	csv	+++	-	-	-	-	-	-	+	+	+++	+++
101	<i>E.coli</i>	csibe	csv	+++	-	-	-	-	-	-	+	+	+++	+++
102	<i>E.coli</i>	csirke	csv	+++	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
103	<i>E.coli</i>	csirke	csv	+++	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++

18. táblázat: csirkéből és pulykából izolált *E. coli* törzsek érzékenysége az amoxicillin-klavulánsav kombinációra, szaporodási intenzitások 1/0,5-64/32 µg/ml amoxicillin/klavulánsav-koncentráció-tartományban

	Faj	Kontroll	Amoxicillin/klavulánsav (µg/ml)						
			64/32	32/16	16/8	8/4	4/2	2/1	1/0,5
1	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++
2	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	++	+++	+++	+++
3	<i>E.coli</i>	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+	+++	+++
5	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	+++	+++
6	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++
7	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	+++	+++
8	<i>E.coli</i>	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
9	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++
10	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++
11	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+	+++	+++	+++
12	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++
13	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	++	+++	+++	+++
14	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++
15	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++
16	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+	+++	+++	+++
17	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	++	+++	+++	+++
18	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++
19	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++
20	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	+++	+++
21	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++
22	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	++	+++	+++	+++
23	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	+++	+++
24	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+	+++	+++
25	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++
26	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++
27	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++
28	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	+++	+++
29	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	++	+++	+++	+++
30	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	++	+++	+++	+++
31	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++
32	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++
33	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++
34	<i>E.coli</i>	+++	-	-	+	++	+++	+++	+++
35	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	+++	+++
36	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++
37	<i>E.coli</i>	+++	-	-	+	+++	+++	+++	+++
38	<i>E.coli</i>	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++



			Amoxicillin/klavulánsav (µg/ml)						
	Faj	Kontroll	64/32	32/16	16/8	8/4	4/2	2/1	1/0,5
39	<i>E.coli</i>	+++	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
40	<i>E.coli</i>	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
41	<i>E.coli</i>	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
42	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++
43	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	+	+++
44	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	-	+++
45	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+	+++	+++	+++
46	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	++	+++
47	<i>E.coli</i>	+++	-	-	+	+++	+++	+++	+++
48	<i>E.coli</i>	+++	-	-	+	+++	+++	+++	+++
49	<i>E.coli</i>	+++	-	-	+	+++	+++	+++	+++
50	<i>E.coli</i>	+++	-	-	+	+++	+++	+++	+++
51	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	+	+++
52	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	++	+++
53	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	+	+++
54	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	++	+++
55	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+	+++	+++	+++
56	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	++	+++
57	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	++	+++
58	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	+	+++
59	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++
60	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++
61	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++
62	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++
63	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++
64	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	++	+++
65	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++
66	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++
67	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	+	+++
68	<i>E.coli</i>	+++	-	+	+++	+++	+++	+++	+++
69	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+	+++	+++	+++
70	<i>E.coli</i>	+++	-	-	+	++	+++	+++	+++
71	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+	+++	+++	+++
72	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+	+++	+++	+++
73	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+	+++	+++	+++
74	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+	+++	+++
75	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	+++	+++
76	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	+	+++
77	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++
78	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	-	+

			Amoxicillin/klavulánsav (µg/ml)						
	Faj	Kontroll	64/32	32/16	16/8	8/4	4/2	2/1	1/0,5
79	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	-	+
80	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	-	++
81	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	-	+
82	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	-	+
83	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+	+++	+++	+++
84	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	+	+++
85	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	-	+++
86	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	+	+++
87	<i>E.coli</i>	+++	-	-	+	+++	+++	+++	+++
88	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+	+++	+++
89	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+	+++	+++
90	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+	+++	+++
91	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+	+++	+++
92	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	-	++	+++
93	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	++	+++	+++	+++
94	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+	+++	+++	+++
95	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	++	+++	+++
96	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	++	+++	+++	+++
97	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+	+++	+++
98	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+	+++	+++	+++
99	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	+	+++	+++	+++
100	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+	+++	+++
101	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+	+++	+++
102	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+	+++	+++
103	<i>E.coli</i>	+++	-	-	-	-	+	+++	+++

19. táblázat: csirkéből és pulykából izolált *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* és *S. Infantis* törzsek érzékenysége amoxicillinre, szaporodási intenzitások 0,25-32 µg/ml amoxicillin-koncentráció-tartományban

Szám	Szerotípus	Állatfaj	Amoxicillin (µg/ml)								
			Kontroll	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
1	<i>S. Enteritidis</i>	csirke	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2	<i>S. Enteritidis</i>	csirke	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
3	<i>S. Enteritidis</i>	csirke	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
4	<i>S. Enteritidis</i>	csirke	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
5	<i>S. Enteritidis</i>	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
6	<i>S. Enteritidis</i>	csirke	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
7	<i>S. Enteritidis</i>	csirke	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
8	<i>S. Enteritidis</i>	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
9	<i>S. Enteritidis</i>	csirke	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
10	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
11	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
12	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
13	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
14	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
15	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
16	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
17	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
18	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
19	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
20	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
21	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
22	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	+	+	+	+	+	+	+++	+++
23	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
24	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
25	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
26	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
27	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
28	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
29	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
30	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
31	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
32	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
33	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
34	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++

Szám	Szerotípus	Állatfaj	Amoxicillin (µg/ml)								
			Kontroll	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
35	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
36	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
37	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	+	+	++	+++	+++
38	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
39	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
40	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
41	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
42	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+++	+++
43	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	++	+++	+++	+++
44	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	++	+++	+++	+++
45	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	++	+	+++
46	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	+	+++	+++	+++
47	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
48	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
49	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
50	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
51	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
52	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
53	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
54	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++	+++
55	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
56	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
57	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
58	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
59	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
60	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
61	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
62	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
63	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
64	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
65	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
66	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
67	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
68	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
69	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
70	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
71	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++



Szám	Szerotípus	Állatfaj	Amoxicillin (µg/ml)									
			Kontroll	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	
109	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
110	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++
111	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++
112	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++
113	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	+++
114	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++
115	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
116	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
117	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++
118	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++

20. táblázat: csirkéből és pulykából izolált *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* és *S. Infantis* törzsek érzékenysége az amoxicillin-klavulánsav kombinációra, szaporodási intenzitások 0,5/0,25-32/16 µg/ml amoxicillin/klavulánsav-koncentráció-tartományban

Szám	Szerotípus	Állatfaj	Kontroll	Amoxicillin/klavulánsav (µg/ml)						
				32/16	16/8	8/4	4/2	2/1	1/0,5	0,5/0,25
1	<i>S. Enteritidis</i>	csirke	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++
2	<i>S. Enteritidis</i>	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
3	<i>S. Enteritidis</i>	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
4	<i>S. Enteritidis</i>	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
5	<i>S. Enteritidis</i>	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
6	<i>S. Enteritidis</i>	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
7	<i>S. Enteritidis</i>	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
8	<i>S. Enteritidis</i>	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
9	<i>S. Enteritidis</i>	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
10	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
11	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
12	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
13	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
14	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
15	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
16	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++
17	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
18	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++
19	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
20	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
21	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
22	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	+	+++
23	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
24	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
25	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
26	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
27	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
28	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
29	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
30	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
31	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
32	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
33	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
34	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
35	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
36	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
37	<i>S. Enteritidis</i>	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++

Szám	Szerotípus	Állatfaj	Kontroll	Amoxicillin/klavulánsav (µg/ml)						
				32/16	16/8	8/4	4/2	2/1	1/0,5	0,5/0,25
38	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
39	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
40	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	+	+++
41	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
42	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
43	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
44	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
45	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
46	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
47	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
48	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
49	S. Enteritidis	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
50	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
51	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
52	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
53	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
54	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
55	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
56	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++
57	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
58	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
59	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
60	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
61	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
62	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
63	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
64	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
65	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
66	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
67	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
68	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
69	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
70	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
71	S. Enteritidis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
72	S.Typhimurium	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
73	S.Typhimurium	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
74	S.Typhimurium	pulyka	+++	-	-	-	-	-	+	+++
75	S.Typhimurium	pulyka	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++



Szám	Szerotípus	Állatfaj	Kontroll	Amoxicillin/klavulánsav (µg/ml)						
				32/16	16/8	8/4	4/2	2/1	1/0,5	0,5/0,25
76	S.Typhimurium	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
77	S.Typhimurium	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
78	S.Typhimurium	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++
79	S.Typhimurium	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
80	S.Typhimurium	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
81	S.Typhimurium	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
82	S.Typhimurium	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
83	S.Typhimurium	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++
84	S.Typhimurium	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
85	S.Typhimurium	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
86	S.Typhimurium	pulyka	+++	-	-	++	+++	+++	+++	+++
87	S.Typhimurium	pulyka	+++	-	-	++	+++	+++	+++	+++
88	S.Typhimurium	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
89	S.Typhimurium	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
90	S.Typhimurium	pulyka	+++	-	-	-	-	-	+	+++
91	S.Typhimurium	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
92	S.Typhimurium	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
93	S.Typhimurium	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
94	S.Typhimurium	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
95	S.Typhimurium	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
96	S.Typhimurium	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
97	S.Typhimurium	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
98	S.Typhimurium	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
99	S.Typhimurium	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
100	S.Typhimurium	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+++
101	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
102	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
103	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
104	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
105	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
106	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++
107	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
108	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
109	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++
110	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
111	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
112	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
113	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++

Szám	Szerotípus	Állatfaj	Kontroll	Amoxicillin/klavulánsav (µg/ml)						
				32/16	16/8	8/4	4/2	2/1	1/0,5	0,5/0,25
114	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
115	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
116	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
117	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++
118	S. Infantis	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++



Sorszám	Állatfaj	Kontroll	Amoxicillin (µg/ml)									
			32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
40	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
41	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
42	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++
43	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
44	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
45	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
46	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
47	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++
48	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++
49	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++
50	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+++
51	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++
52	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++
53	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++
54	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
55	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
56	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
57	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
58	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
59	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
60	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+++
61	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+++
62	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+++
63	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+++
64	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+++
65	pulyka	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
66	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++
67	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+++
68	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++
69	pulyka	+++	-	+	++	++	++	++	++	++	++	+++
70	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++
71	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++
72	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+++
73	pulyka	+++	-	-	-	-	-	+	+	++	++	+++
74	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++
75	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++
76	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+++
77	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
78	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++
79	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++



22. táblázat: csirkéből és pulykából izolált *P. multocida* törzsek érzékenysége az amoxicillin-klavulánsav kombinációra, szaporodási intenzitások 0,25/0,125-32/16 µg/ml amoxicillin/klavulánsav-koncentráció-tartományban

Sorszám	Állatfaj	Kontroll	Amoxicillin (µg/ml)							
			32/16	16/8	8/4	4/2	2/1	1/0,5	0,5/0,25	0,25/0,125
1	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+++	+++
2	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+	+
3	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+	++
4	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+	++
5	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+	++
6	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+	++
7	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+	+
8	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+
9	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+
10	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+
11	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+
12	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+
13	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+
14	pulyka	+++	-	-	-	-	+	+	++	+++
15	pulyka	+++	-	-	-	+	++	+++	+++	+++
16	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+++	+
17	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	++	+
18	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+	+
19	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+	+
20	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+
21	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+	+
22	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+	+
23	csirke	+++	-	-	-	-	-	+	+	+
24	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+	+
25	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+	+
26	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+	+
27	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	+	+
28	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+	+
29	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+	+
30	pulyka	+++	-	-	-	-	+	+	+	+
31	pulyka	+++	-	-	-	-	-	+	+	+
32	pulyka	+++	-	-	-	-	+	+	+	+
33	pulyka	+++	-	-	+	+	++	++	+++	+++
34	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	+	++
35	pulyka	+++	-	-	-	+	++	++	+	++

Sorszám	Állatfaj	Kontroll	Amoxicillin (µg/ml)								
			32/16	16/8	8/4	4/2	2/1	1/0,5	0,5/0,25	0,25/0,125	
36	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	++
37	pulyka	+++	-	-	-	-	+	+	+	+	++
38	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+
39	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+
41	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+
42	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+
43	pulyka	+++	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++
44	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+
45	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+
46	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+
47	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+
48	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+
49	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+
50	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+
51	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+
52	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+
53	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+
54	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+
55	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+
56	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+
57	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+
58	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+
59	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+
60	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+
61	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+
62	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+
63	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+
64	csirke	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+
65	pulyka	+++	-	-	-	-	+	+	+++	+++	+++
66	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+
67	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+
68	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+
69	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+
70	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+
71	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
72	pulyka	+++	-	-	-	-	-	-	-	+	+
73	pulyka	+++	-	-	-	-	+	+	++	++	+





23. táblázat: az amoxicillin és a klavulánsav mért koncentráció-értékei és bomlásának nyomonkövetése az "A" termékben és a referencia-termékben különböző keménységi fokú (GH<sup>0</sup>=2, 6, 10) ivóvízmintákban

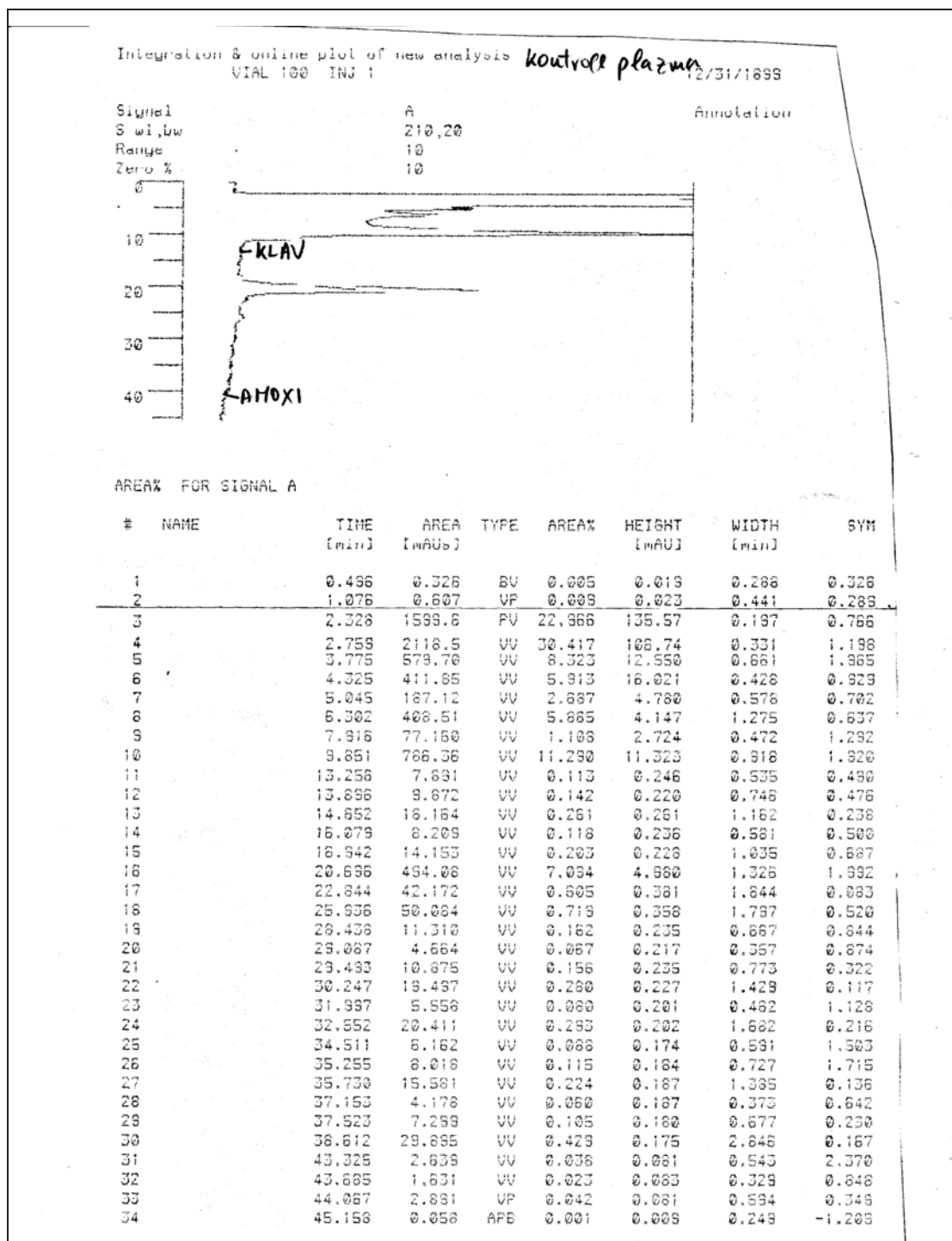
		"A" termék - amoxicillin-koncentráció (mg/ml)					Referencia termék - amoxicillin-koncentráció (mg/ml)				
Idő (h)	GH <sup>0</sup>	1	2	3	Átlag	Szórás	1	2	3	Átlag	Szórás
0	2	1,43	1,48	1,52	<b>1,48</b>	0,05	1,79	1,77	1,74	<b>1,77</b>	0,03
	6	1,41	1,43	1,45	<b>1,43</b>	0,02	1,67	1,68	1,71	<b>1,69</b>	0,02
	10	1,46	1,49	1,42	<b>1,46</b>	0,04	1,68	1,71	1,76	<b>1,72</b>	0,04
2	2	1,42	1,46	1,44	<b>1,44</b>	0,02	1,66	1,72	1,74	<b>1,71</b>	0,04
	6	1,37	1,41	1,32	<b>1,37</b>	0,05	1,62	1,64	1,61	<b>1,62</b>	0,02
	10	1,36	1,41	1,43	<b>1,40</b>	0,04	1,63	1,65	1,66	<b>1,65</b>	0,02
6	2	1,35	1,41	1,4	<b>1,39</b>	0,03	1,62	1,68	1,7	<b>1,67</b>	0,04
	6	1,31	1,35	1,37	<b>1,34</b>	0,03	1,56	1,59	1,6	<b>1,58</b>	0,02
	10	1,36	1,32	1,41	<b>1,36</b>	0,05	1,57	1,62	1,61	<b>1,60</b>	0,03
12	2	1,3	1,35	1,35	<b>1,33</b>	0,03	1,57	1,6	1,61	<b>1,59</b>	0,02
	6	1,21	1,27	1,29	<b>1,26</b>	0,04	1,45	1,5	1,49	<b>1,48</b>	0,03
	10	1,3	1,25	1,28	<b>1,28</b>	0,03	1,47	1,51	1,54	<b>1,51</b>	0,04
24	2	1,21	1,25	1,3	<b>1,25</b>	0,05	1,47	1,5	1,51	<b>1,49</b>	0,02
	6	1,2	1,15	1,18	<b>1,18</b>	0,03	1,36	1,39	1,45	<b>1,40</b>	0,05
	10	1,17	1,19	1,2	<b>1,19</b>	0,02	1,42	1,45	1,4	<b>1,42</b>	0,03
		"A" termék - klavulánsav-koncentráció (mg/ml)					Referencia termék - klavulánsav-koncentráció (mg/ml)				
Idő (h)	GH <sup>0</sup>	1	2	3	Átlag	Szórás	1	2	3	Átlag	Szórás
0	2	0,362	0,369	0,362	<b>0,364</b>	0,004	0,41	0,4	0,398	<b>0,403</b>	0,006
	6	0,333	0,346	0,339	<b>0,339</b>	0,007	0,391	0,394	0,405	<b>0,397</b>	0,007
	10	0,352	0,357	0,352	<b>0,354</b>	0,003	0,391	0,394	0,398	<b>0,394</b>	0,004
2	2	0,336	0,349	0,343	<b>0,343</b>	0,007	0,376	0,376	0,384	<b>0,379</b>	0,005
	6	0,307	0,312	0,315	<b>0,311</b>	0,004	0,362	0,364	0,368	<b>0,365</b>	0,003
	10	0,321	0,326	0,329	<b>0,325</b>	0,004	0,36	0,368	0,362	<b>0,363</b>	0,004
6	2	0,318	0,319	0,318	<b>0,318</b>	0,001	0,354	0,359	0,355	<b>0,356</b>	0,003
	6	0,291	0,289	0,298	<b>0,293</b>	0,005	0,341	0,349	0,343	<b>0,344</b>	0,004
	10	0,302	0,303	0,307	<b>0,304</b>	0,003	0,334	0,337	0,342	<b>0,338</b>	0,004
12	2	0,286	0,288	0,292	<b>0,289</b>	0,003	0,327	0,318	0,319	<b>0,321</b>	0,005
	6	0,262	0,264	0,258	<b>0,261</b>	0,003	0,309	0,301	0,3	<b>0,303</b>	0,005
	10	0,262	0,271	0,273	<b>0,269</b>	0,006	0,292	0,295	0,296	<b>0,294</b>	0,002
24	2	0,253	0,269	0,261	<b>0,261</b>	0,008	0,283	0,289	0,291	<b>0,288</b>	0,004
	6	0,23	0,231	0,226	<b>0,229</b>	0,003	0,265	0,268	0,27	<b>0,268</b>	0,003
	10	0,232	0,241	0,235	<b>0,236</b>	0,005	0,259	0,263	0,265	<b>0,262</b>	0,003

24. táblázat: az amoxicillin és a klavulánsav mért koncentráció-értékei és bomlásának nyomonkövetése az "A" termékben és a referencia-termékben különböző pH-jú (pH=3, 7, 10) oldatokban

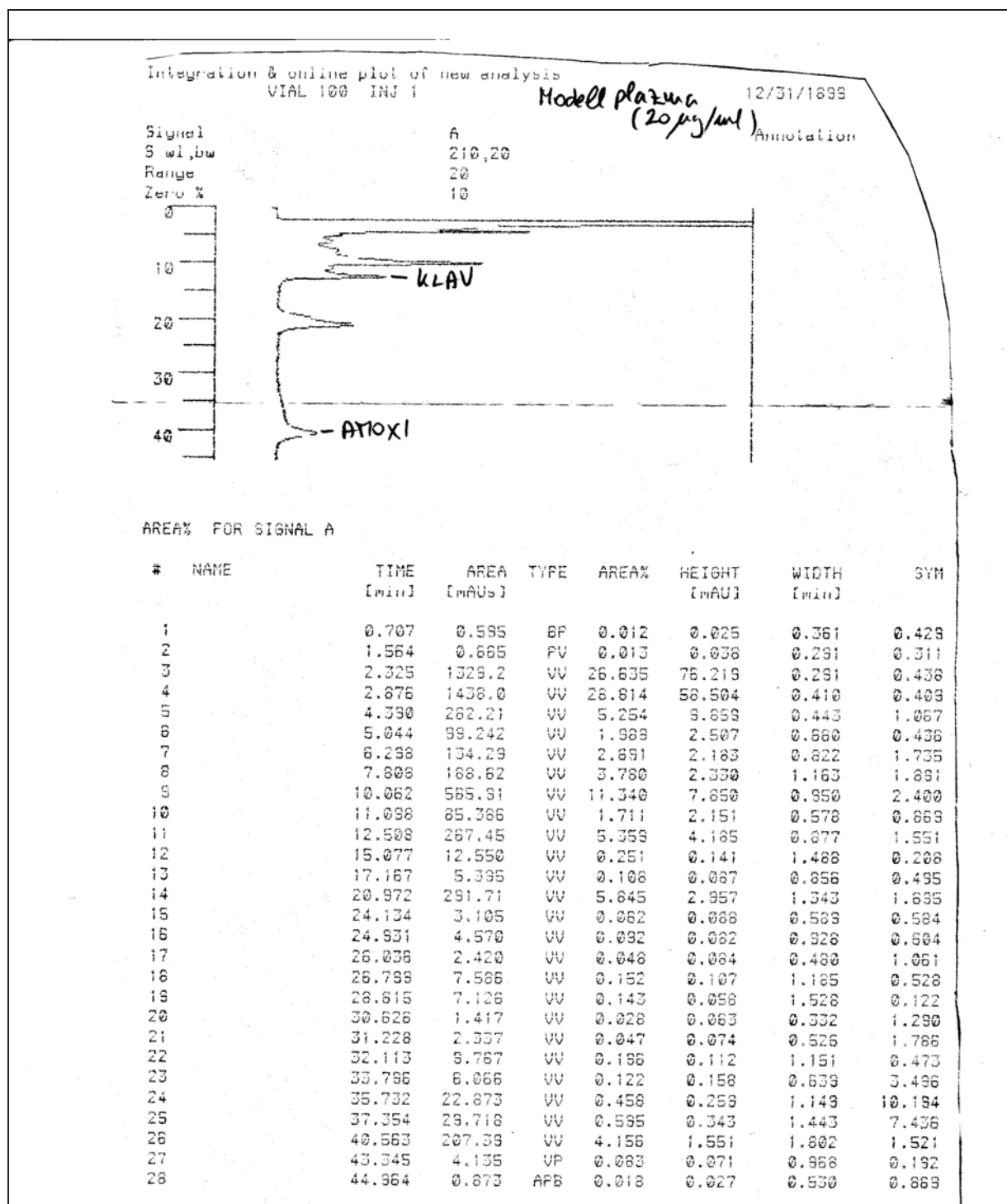
		"A" termék - amoxicillin-koncentráció (mg/ml)					Referencia termék - amoxicillin-koncentráció (mg/ml)				
Idő (h)	pH	1	2	3	Átlag	Szórás	1	2	3	Átlag	Szórás
0	3	1,42	1,49	1,51	<b>1,47</b>	0,05	1,73	1,71	1,67	<b>1,70</b>	0,03
	7	1,42	1,49	1,43	<b>1,45</b>	0,04	1,67	1,68	1,65	<b>1,67</b>	0,02
	10	1,5	1,48	1,45	<b>1,48</b>	0,03	1,64	1,67	1,75	<b>1,69</b>	0,06
2	3	1,42	1,44	1,46	<b>1,44</b>	0,02	1,66	1,75	1,63	<b>1,68</b>	0,06
	7	1,44	1,36	1,4	<b>1,40</b>	0,04	1,57	1,62	1,64	<b>1,61</b>	0,04
	10	1,41	1,44	1,35	<b>1,40</b>	0,05	1,56	1,59	1,63	<b>1,59</b>	0,04
6	3	1,35	1,41	1,4	<b>1,39</b>	0,03	1,59	1,65	1,66	<b>1,63</b>	0,04
	7	1,26	1,33	1,32	<b>1,30</b>	0,04	1,52	1,46	1,44	<b>1,47</b>	0,04
	10	1,27	1,33	1,3	<b>1,30</b>	0,03	1,49	1,43	1,45	<b>1,46</b>	0,03
12	3	1,31	1,34	1,35	<b>1,33</b>	0,02	1,54	1,56	1,58	<b>1,56</b>	0,02
	7	1,17	1,24	1,21	<b>1,21</b>	0,04	1,39	1,35	1,41	<b>1,38</b>	0,03
	10	1,18	1,22	1,18	<b>1,19</b>	0,02	1,35	1,32	1,38	<b>1,35</b>	0,03
24	3	1,14	1,2	1,18	<b>1,17</b>	0,03	1,37	1,4	1,4	<b>1,39</b>	0,02
	7	1,01	1,07	1,06	<b>1,05</b>	0,03	1,17	1,14	1,22	<b>1,18</b>	0,04
	10	0,97	1,02	1,03	<b>1,01</b>	0,03	1,12	1,15	1,16	<b>1,14</b>	0,02
		"A" termék - klavulánsav-koncentráció (mg/ml)					Referencia termék - klavulánsav-koncentráció (mg/ml)				
Idő (h)	pH	1	2	3	Átlag	Szórás	1	2	3	Átlag	Szórás
0	3	0,348	0,347	0,345	<b>0,347</b>	0,002	0,41	0,411	0,411	<b>0,411</b>	0,001
	7	0,363	0,36	0,361	<b>0,361</b>	0,002	0,398	0,392	0,404	<b>0,398</b>	0,006
	10	0,355	0,348	0,352	<b>0,352</b>	0,004	0,401	0,407	0,411	<b>0,406</b>	0,005
2	3	0,263	0,269	0,27	<b>0,267</b>	0,004	0,312	0,31	0,306	<b>0,309</b>	0,003
	7	0,343	0,354	0,351	<b>0,349</b>	0,006	0,375	0,383	0,378	<b>0,379</b>	0,004
	10	0,307	0,311	0,317	<b>0,312</b>	0,005	0,354	0,36	0,357	<b>0,357</b>	0,003
6	3	0,082	0,086	0,088	<b>0,085</b>	0,003	0,101	0,094	0,097	<b>0,097</b>	0,004
	7	0,328	0,322	0,325	<b>0,325</b>	0,003	0,34	0,343	0,352	<b>0,345</b>	0,006
	10	0,236	0,227	0,234	<b>0,232</b>	0,005	0,272	0,281	0,275	<b>0,276</b>	0,005
12	3	0,023	0,027	0,023	<b>0,024</b>	0,002	0,02	0,028	0,027	<b>0,025</b>	0,004
	7	0,206	0,196	0,202	<b>0,201</b>	0,005	0,218	0,234	0,237	<b>0,230</b>	0,010
	10	0,121	0,123	0,127	<b>0,124</b>	0,003	0,132	0,139	0,127	<b>0,133</b>	0,006
24	3	0,001	0,001	0,001	<b>0,001</b>	0,000	0	0,001	0,001	<b>0,001</b>	0,001
	7	0,144	0,154	0,151	<b>0,150</b>	0,005	0,149	0,157	0,154	<b>0,153</b>	0,004
	10	0,037	0,046	0,04	<b>0,041</b>	0,005	0,051	0,055	0,056	<b>0,054</b>	0,003

25. táblázat: az amoxicillin és a klavulánsav mért koncentráció-értékei és bomlásának nyomonkövetése az "A" termékben és a referencia-termékben fém- és műanyag itatóedényben, ivóvízben feloldva (pH=7,09)

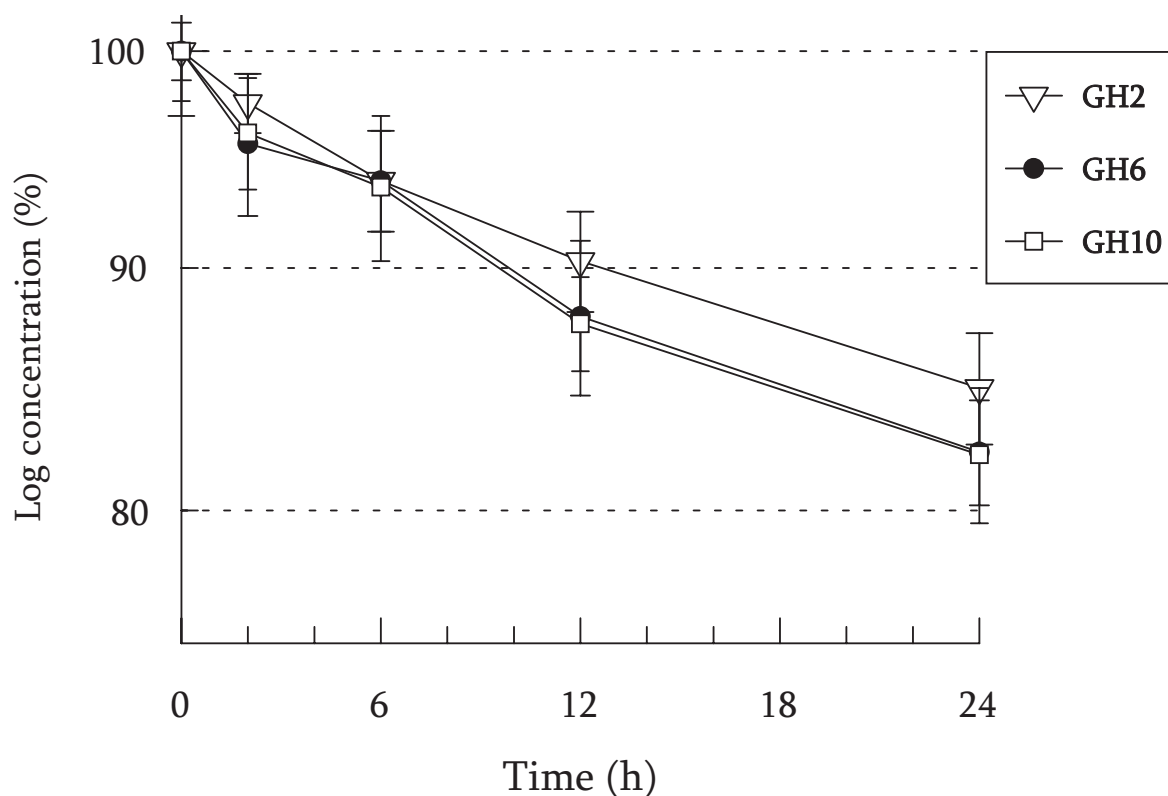
		"A" termék - amoxicillin-koncentráció (mg/ml)					Referencia termék - amoxicillin-koncentráció (mg/ml)				
Idő (h)	Edény	1	2	3	Átlag	Szórás	1	2	3	Átlag	Szórás
0	Műag	1,46	1,53	1,49	<b>1,49</b>	0,04	1,68	1,71	1,72	<b>1,70</b>	0,02
	Fém	1,47	1,43	1,5	<b>1,47</b>	0,04	1,71	1,76	1,73	<b>1,73</b>	0,03
2	Műag	1,44	1,5	1,46	<b>1,47</b>	0,03	1,68	1,63	1,73	<b>1,68</b>	0,05
	Fém	1,33	1,3	1,38	<b>1,34</b>	0,04	1,73	1,69	1,68	<b>1,70</b>	0,03
6	Műag	1,41	1,44	1,42	<b>1,42</b>	0,02	1,57	1,62	1,63	<b>1,61</b>	0,03
	Fém	1,02	0,99	1,07	<b>1,03</b>	0,04	1,43	1,48	1,54	<b>1,48</b>	0,06
12	Műag	1,32	1,3	1,39	<b>1,34</b>	0,05	1,52	1,54	1,55	<b>1,54</b>	0,02
	Fém	0,48	0,47	0,54	<b>0,50</b>	0,04	1,13	1,17	1,26	<b>1,19</b>	0,07
24	Műag	1,21	1,28	1,24	<b>1,24</b>	0,04	1,42	1,44	1,48	<b>1,45</b>	0,03
	Fém	0,13	0,17	0,14	<b>0,15</b>	0,02	0,72	0,77	0,73	<b>0,74</b>	0,03
		"A" termék - klavulánsav-koncentráció (mg/ml)					Referencia termék - klavulánsav-koncentráció (mg/ml)				
Idő (h)	Edény	1	2	3	Átlag	Szórás	1	2	3	Átlag	Szórás
0	Műag	0,354	0,359	0,355	<b>0,356</b>	0,003	0,405	0,401	0,399	<b>0,402</b>	0,003
	Fém	0,355	0,357	0,368	<b>0,360</b>	0,007	0,393	0,397	0,398	<b>0,396</b>	0,003
2	Műag	0,343	0,351	0,35	<b>0,348</b>	0,004	0,398	0,397	0,39	<b>0,395</b>	0,004
	Fém	0,336	0,341	0,342	<b>0,340</b>	0,003	0,379	0,376	0,371	<b>0,375</b>	0,004
6	Műag	0,326	0,327	0,331	<b>0,328</b>	0,003	0,378	0,375	0,377	<b>0,377</b>	0,002
	Fém	0,306	0,31	0,312	<b>0,309</b>	0,003	0,337	0,336	0,341	<b>0,338</b>	0,003
12	Műag	0,28	0,284	0,281	<b>0,282</b>	0,002	0,329	0,327	0,323	<b>0,326</b>	0,003
	Fém	0,251	0,256	0,258	<b>0,255</b>	0,004	0,279	0,287	0,284	<b>0,283</b>	0,004
24	Műag	0,254	0,259	0,256	<b>0,256</b>	0,003	0,299	0,295	0,293	<b>0,296</b>	0,003
	Fém	0,205	0,208	0,207	<b>0,207</b>	0,002	0,233	0,227	0,225	<b>0,228</b>	0,004



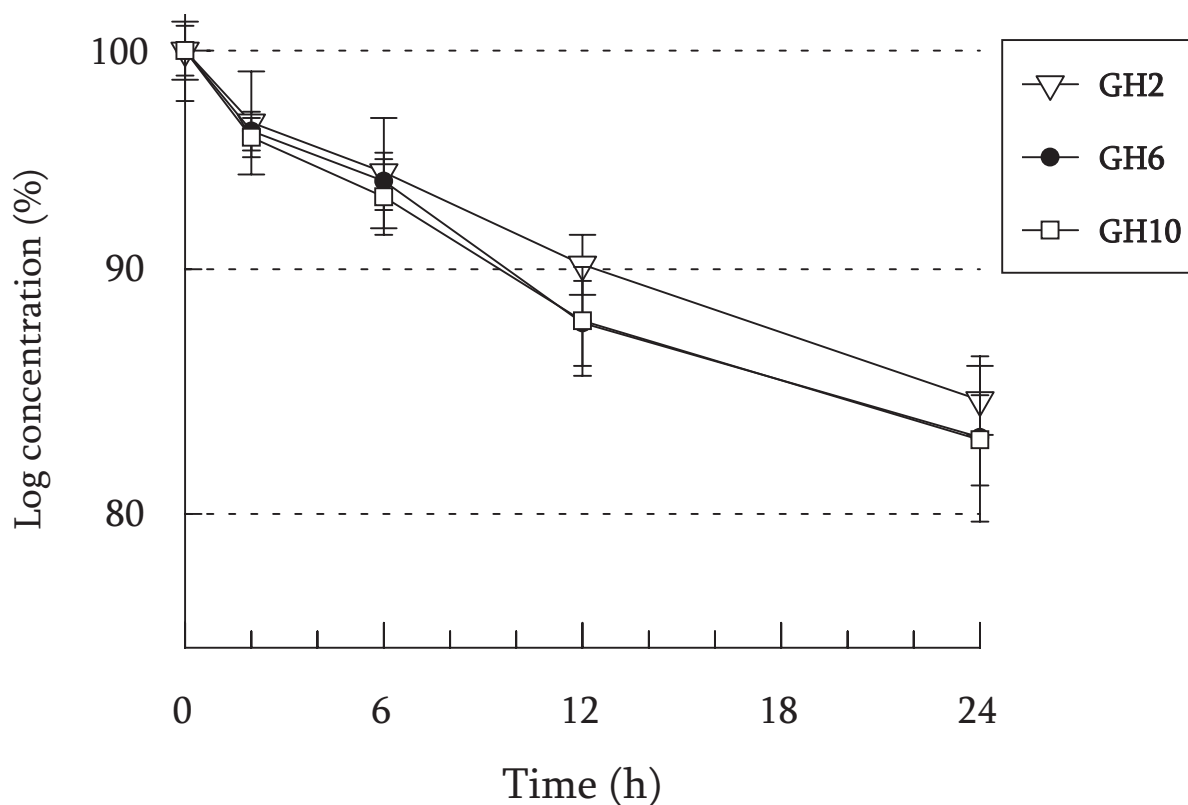
1. ábra: a hatóanyagot nem tartalmazó, kontroll csirke-plazmaminták kromatogramja az amoxicillin és a klavulánsav retenciós idejének feltüntetésével



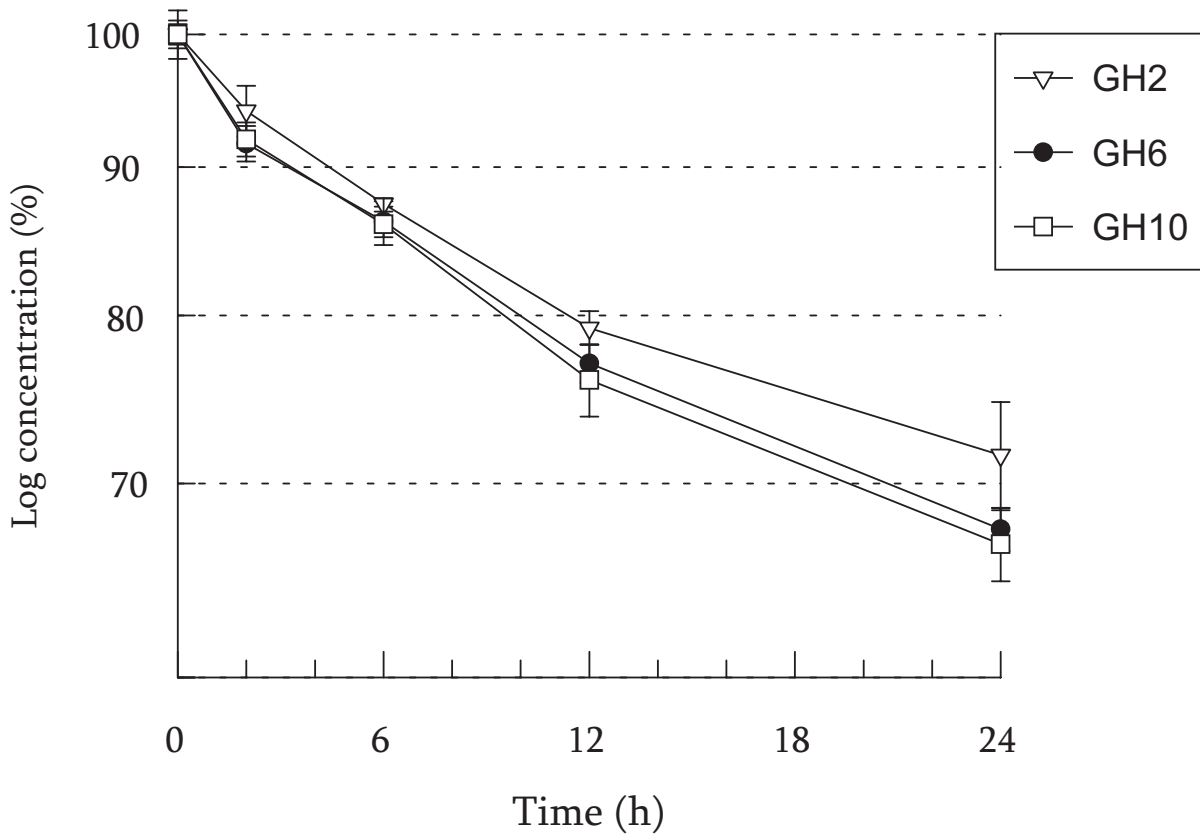
2. ábra: a hatóanyagok kontroll csirke-plazmamintákhoz való hozzáadásával készült ún. "spike"-olt minta kromatogramja



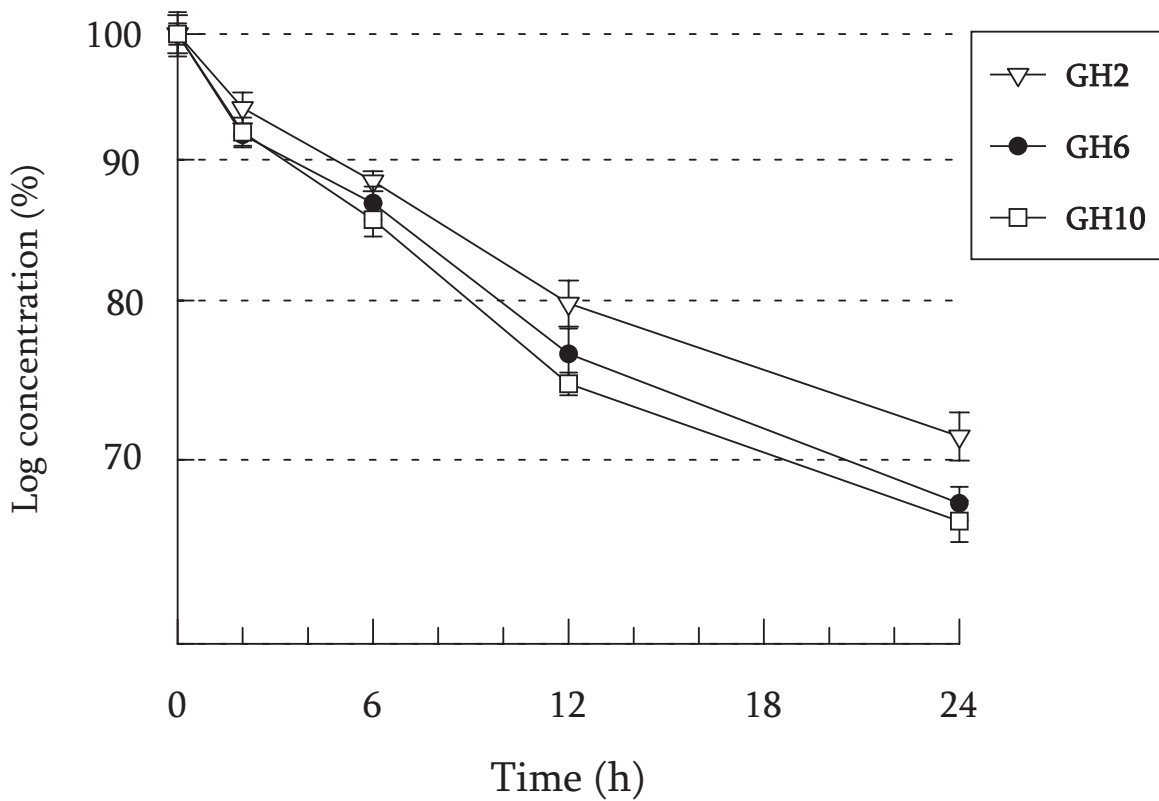
3. ábra: az amoxicillin koncentráció csökkenésének logaritmikus ábrázolása az "A" termékben különböző keménységi fokú ( $\text{GH}^0=2, 6, 10$ ) ivóvízmintákban



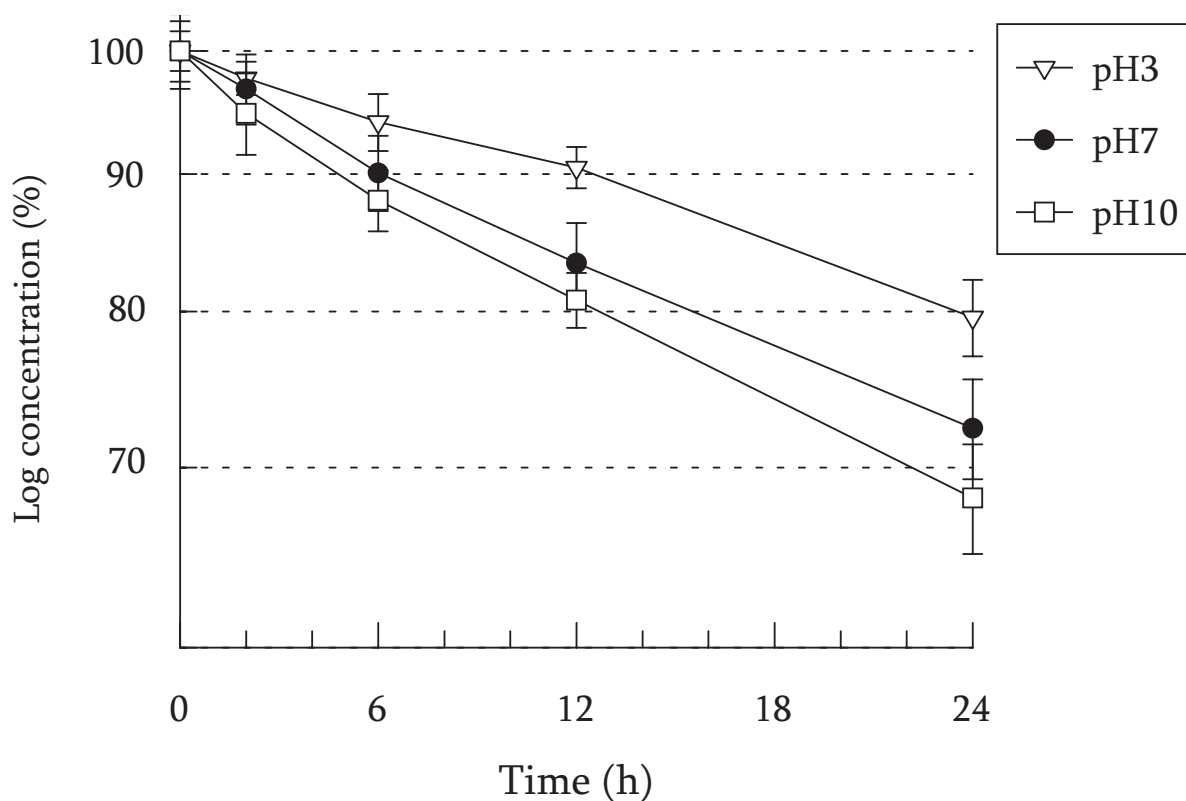
4. ábra: az amoxicillin koncentráció csökkenésének logaritmikus ábrázolása a referencia termékben különböző keménységi fokú ( $\text{GH}^0=2, 6, 10$ ) ivóvízmintákban



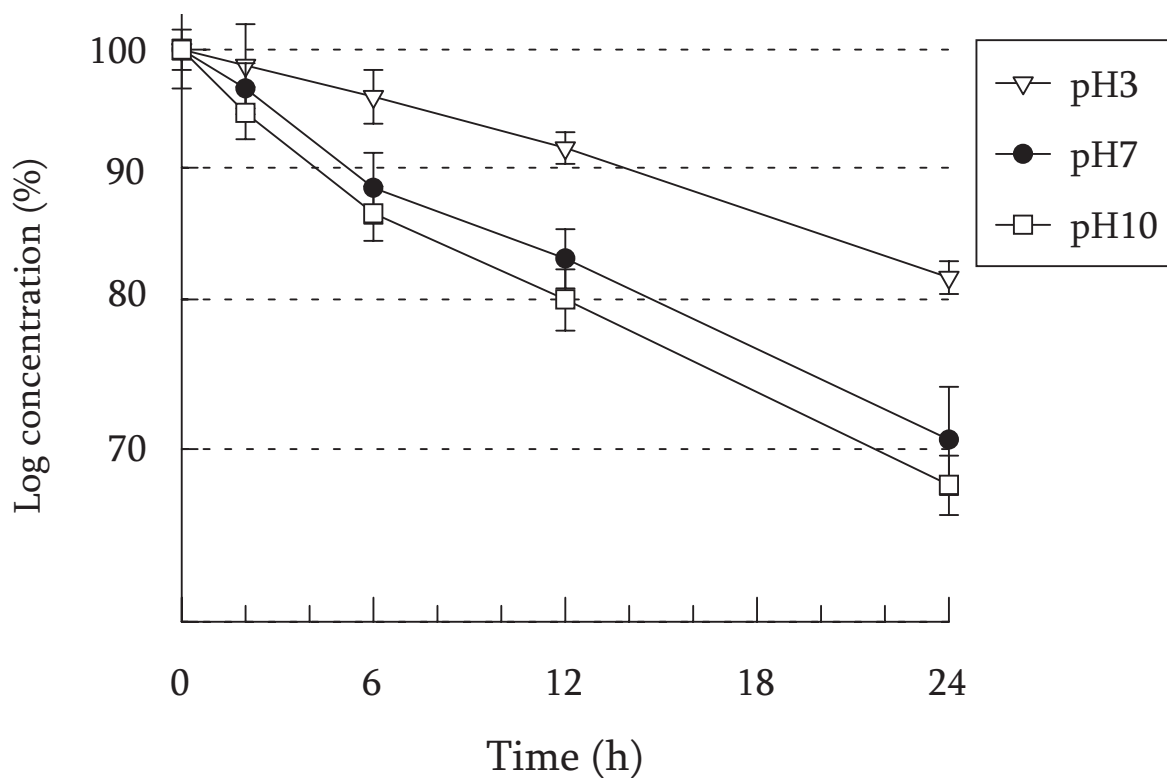
5. ábra: a klavulánsav koncentráció csökkenésének logaritmusos ábrázolása az "A" termékben különböző keménységi fokú (GH0=2, 6, 10) ivóvízmintákban



6. ábra: a klavulánsav koncentráció csökkenésének logaritmusos ábrázolása a referencia termékben különböző keménységi fokú (GH0=2, 6, 10) ivóvízmintákban

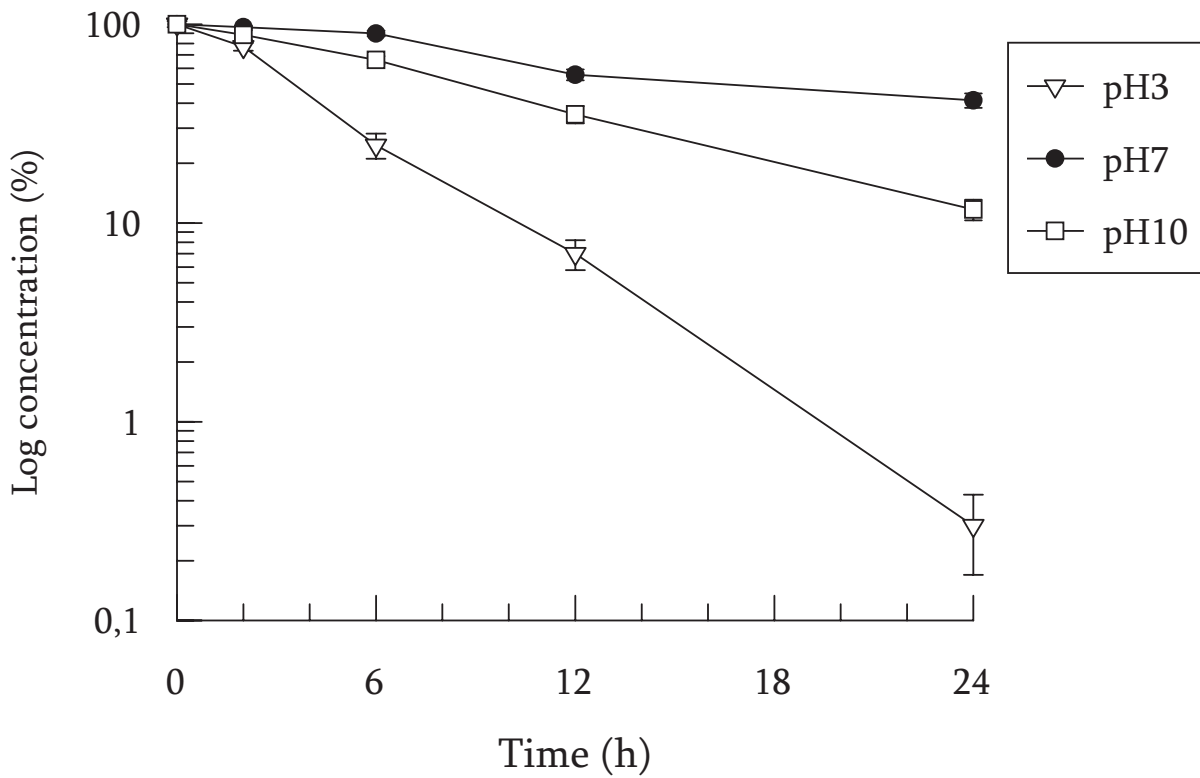


7. ábra: az amoxicillin koncentráció csökkenésének logaritmikus ábrázolása az "A" termékben különböző pH-jú (pH=3, 7, 10) oldatokban

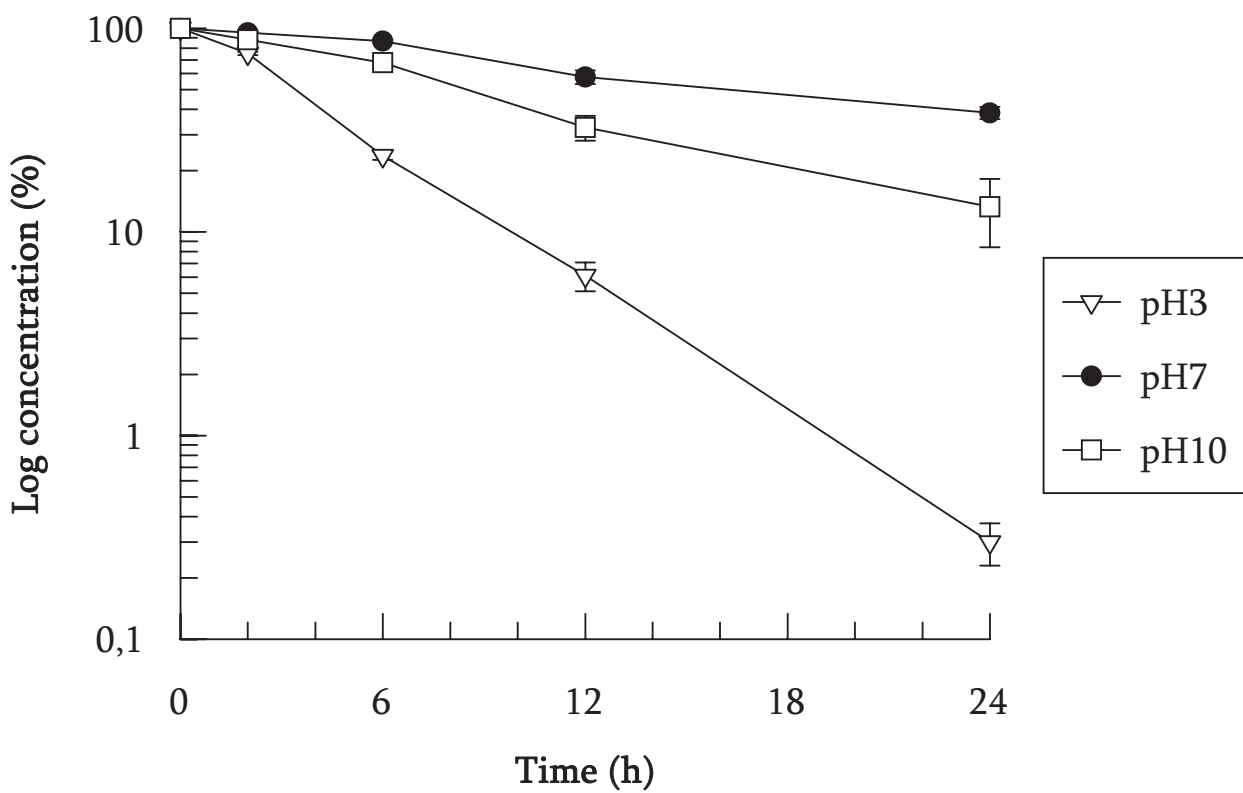


8. ábra: az amoxicillin koncentráció csökkenésének logaritmikus ábrázolása a referencia termékben különböző pH-jú (pH=3, 7, 10) oldatokban

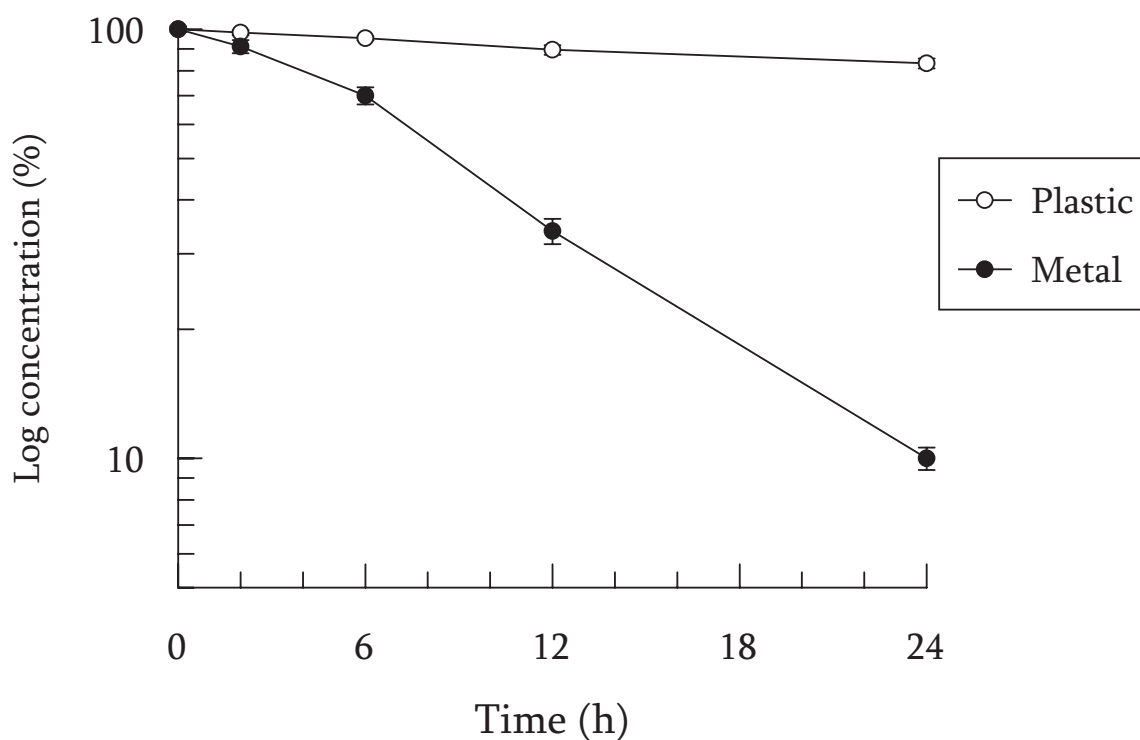




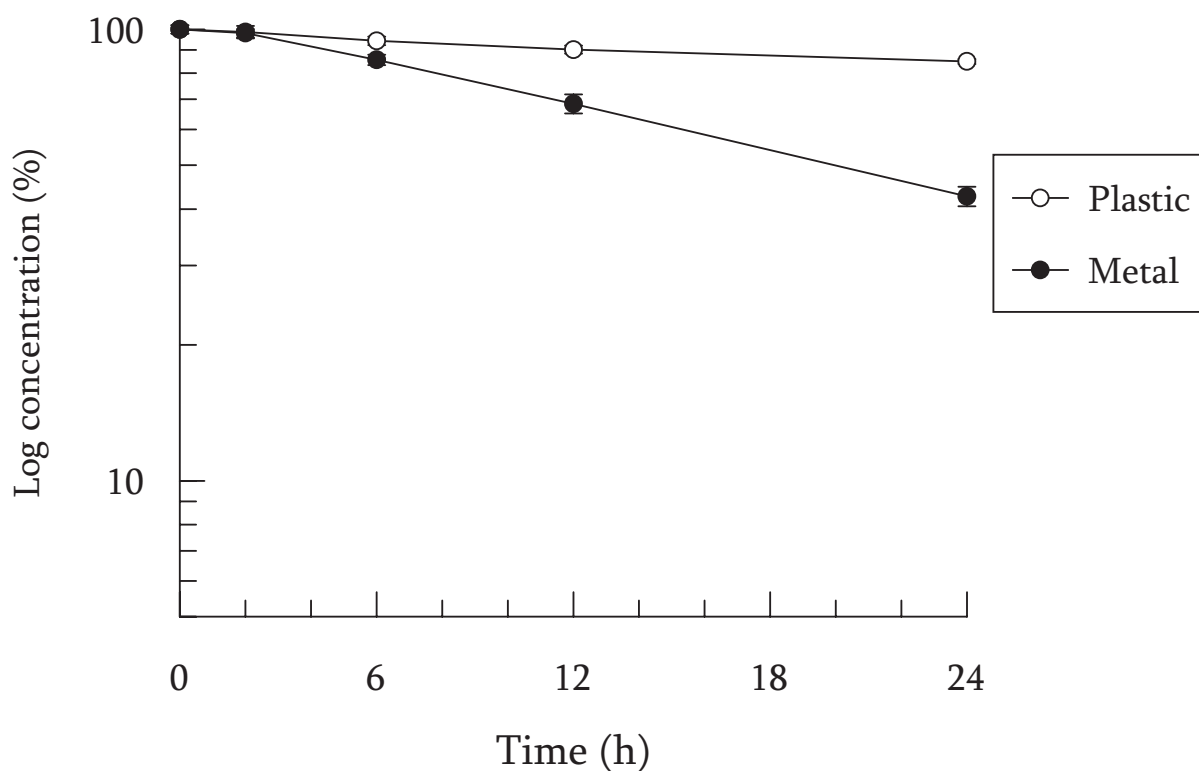
9. ábra: a klavulánsav koncentráció csökkenésének logaritmusos ábrázolása az "A" termékben különböző pH-jú (pH=3, 7, 10) oldatokban



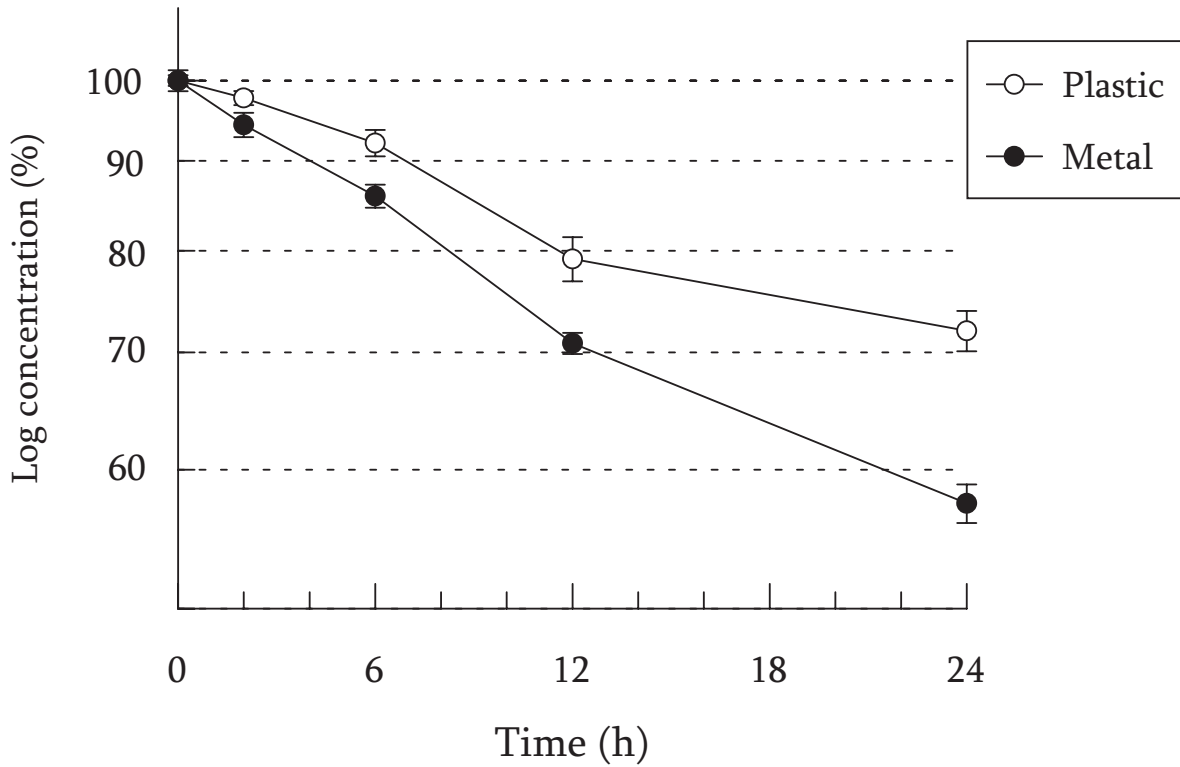
10. ábra: a klavulánsav koncentráció csökkenésének logaritmusos ábrázolása referencia termékben különböző pH-jú (pH=3, 7, 10) oldatokban



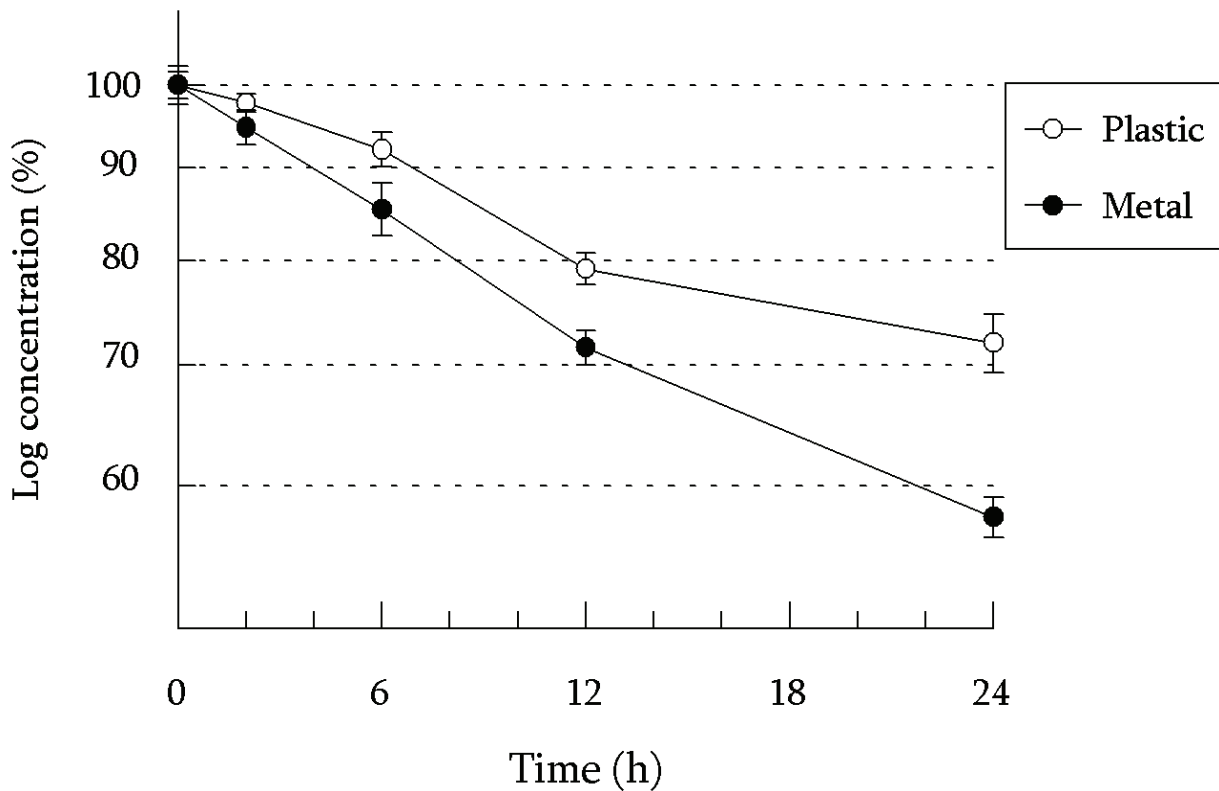
11. ábra: az amoxicillin koncentráció csökkenésének logaritmikus ábrázolása az "A" termékben fém- és műanyag itatóedényben (pH=7,09 ivóvízben)



12. ábra: az amoxicillin koncentráció csökkenésének logaritmikus ábrázolása a referencia termékben fém- és műanyag itatóedényben (pH=7,09 ivóvízben)



13. ábra: a klavulánsav koncentráció csökkenésének logaritmikus ábrázolása az „A” termékben fém- és műanyag itatóedényben (pH=7,09 ivóvízben)



14. ábra: a klavulánsav koncentráció csökkenésének logaritmikus ábrázolása a referencia termékben fém- és műanyag itatóedényben (pH=7,09 ivóvízben)

## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, dr. Gálfi Péter és dr. Semjén Gábor egyetemi tanár Úrknak a téma kidolgozásában, a kísérletek kivitelezésében és az eredmények értelmezésében nyújtott segítségükért, valamint, hogy lehetővé tették, hogy munkámat a SZIE-ÁOTK Gyógyszertani és Méregtani Tanszékén végezzem el. Köszönöm a témabizottsági tagoknak, dr. Lehel József docens Úrnak és dr. Csikó György adjunktus Úrnak, hogy munkám során mind az elméleti kérdések, mind a gyakorlati problémák felmerülése esetén segítségemre voltak. Köszönöm Nagy Gábor kollégámnak az analitikai módszer kidolgozásában és a HPLC-mérések során nyújtott segítségét. Köszönöm dr. Nagy Béla akadémikus Úrnak, dr. Magyar Tibor igazgató Úrnak és dr. Kaszanyitzky Évának a bakteriológiai vizsgálatok során nyújtott segítségét. Köszönöm továbbá TDK-s és szakdolgozó hallgatóimnak, Papp Melindának, Tóth Ádámnak és Tóth Istvánnak a sok segítséget. Nélkülük ez a dolgozat csak jóval később születhetett volna meg.