

Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola
Budapest

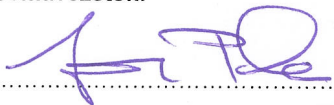
**Korszerű antimikrobiális
kombinációk fejlesztése kutyák
külső hallójárat-gyulladásának
gyógykezelésére**

PhD Tézisek

Dr. Gyetvai Béla

2018.

Témavezetők:

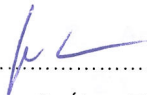


Dr. Gálfi Péter DSc, egyetemi tanár

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

Állatorvostudományi Egyetem, Budapest

Témavezető



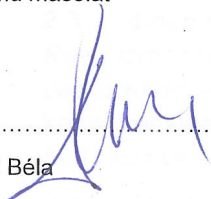
Dr. Jerzsele Ákos, PhD, egyetemi docens

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

Állatorvostudományi Egyetem, Budapest

Társtémavezető

1./8. számú másolat



Dr. Gyetvai Béla

Tartalomjegyzék

Table of contents	3
1. A vizsgálatok célja	5
2. Anyag és módszer	7
2.1. Marbofloxacin és gentamicin kombinációjának hatása <i>Pseudomonas aeruginosa</i> törzsek érzékenységre.....	7
2.2. Gentamicin 1%-ban alkalmazott DMSO hatása egyrétegű sejtenyészet integritására, illetve gentamicin egyrétegű sejtenyészeten való átjutására <i>in vitro</i> körülmények között.....	8
2.3. 8-napos sorozatpasszálás hatása <i>Pseudomonas aeruginosa</i> és <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> törzsekre szubletális koncentrációban alkalmazott marbofloxacin–gentamicin (1:1) kombinációjában, illetve marbofloxacin oldatban	9
2.4. <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus canis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , illetve <i>Malassezia pachydermatis</i> törzsek marbofloxaccinnal és ketokonazzal szemben mutatott érzékenységi vizsgálatainak összehasonlítása 2010-ben és 2017—2018 között gyűjtött törzsekkel	11
2.5. <i>Malassezia pachydermatis</i> törzsek érzékenységének vizsgálata planktonikus és biofilm környezetben	12
3. Eredmények.....	14

3.1. Marbofloxacin és gentamicin kombinációjának hatása <i>Pseudomonas aeruginosa</i> törzsek érzékenységére.....	14
3.2. Gentamicinel 1%-ban alkalmazott DMSO hatása egyrétegű sejtenyészet integritására, illetve gentamicin egyrétegű sejtenyészetben való átjutására <i>in vitro</i> körülmények között.....	15
3.3. 8-napos sorozatpasszálás hatása <i>Pseudomonas aeruginosa</i> és <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> törzsekre szubletális koncentrációban alkalmazott marbofloxacin–gentamicin (1:1) kombinációjában, illetve marbofloxacin oldatban	16
3.4. <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus canis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , illetve <i>Malassezia pachydermatis</i> törzsek marbofloxaccinnal és ketokonazollal szemben mutatott érzékenységi vizsgálatainak összehasonlítása 2010-ben és 2017-2018 között gyűjtött törzsekkel	18
3.5. <i>Malassezia pachydermatis</i> törzsek érzékenységének vizsgálata planktonikus és biofilm környezetben	19
4. Új tudományos eredmények	20
5. Szerzői publikációk.....	22
5.1. Eredeti közlemények	22
5.2. Konferencia előadások	24
6. Köszönetnyilvánítás	25

1. A vizsgálatok célja

Az antibiotikumokkal szemben növekvő rezisztencia, az állatgyógyászatban alkalmazható antibiotikumok használatának korlátozása, valamint az új antimikrobiális hatóanyagok fejlesztésének rendkívül ritka volta az állatgyógyászat területén ráirányítja a figyelmet, a már meglévő hatóanyagok kombinációiban rejlő lehetőségek minél szélesebb körben történő megismerésének igényére. Munkám során ilyen kérdésekre kerestünk gyakorlatban is alkalmazható válaszokat, kutyák külső halljártat gyulladás eseteinek kezeléséhez.

Vizsgálataink során *P. aeruginosa* törzsek antimikrobiális érzékenységét vizsgálatuk marbofloxacinra, gentamicinre, illetve ezek kombinációjára vonatkozóan abból a célból, hogy megállapítsuk, van-e a *P. aeruginosa* törzsek érzékenységét befolyásoló interakció a hatóanyagok

együttes alkalmazása esetén, a két hatóanyag monoterápiás alkalmazásával összehasonlításban.

Vizsgáltuk továbbá, hogy gentamicinhez 1%-ban adott DMSO milyen hatással van a IPEC-J2 egyrétegű sejtenyészet integritására, illetve a gentamicin sejtrétegen keresztli átjutására.

Célunk volt az is, hogy megvizsgáljunk *Staphylococcus pseudintermedius* és *Pseudomonas aeruginosa* törzsek rezisztencia viszontainak alakulását marbofloxacin-gentamicin (1:1) kombinációban, illetve a hatóanyagokat külön-külön szubletális koncentrációban alkalmazva 8 napi passzálás során.

Megvizsgáltuk továbbá azt is, hogy vajon a 2010-ben és 2017–2018-ben gyűjtött *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus canis*, *Pseudomonas aeruginosa* és *Malassezia pachydermatis* törzsek érzékenysége mutat-e különbséget marbofloxacinnal és ketokonazollal szemben

A doktori értekezés további célkitűzése volt *Malassezia pachydermatis* törzsek érzékenységi különbségének megfigyelése planktonikus és biofilm környezetben.

2. Anyag és módszer

2.1. Marbofloxacin és gentamicin kombinációjának hatása *Pseudomonas aeruginosa* törzsek érzékenységére

Ebben a vizsgálatban 68 *P. aeruginosa* törzset izoláltunk kutyák otitis externa klinikai eseteiből. A törzsek Magyarország különböző földrajzi területeiről származtak. A MIC meghatározásokat mikrohígítási módszerrel végeztük, 96 férőhelyes mikrotitrátor lemezen a CLSI M7-A9 módszer szerint. Az interakció típusának és mértékének mérésére FICI (Fractional Inhibitory Concentration Index) meghatározást végeztünk.

2.2. Gentamicin 1%-ban alkalmazott DMSO hatása egyrétegű sejtenyészet integritására, illetve gentamicin egyrétegű sejtenyészeten való átjutására *in vitro* körülmények között

Ehhez a vizsgálathoz IPEC-J2 sejtvoalat használtunk. Az egyrétegű sejtenyészet, amennyiben a réteg integritása megtartott jelentős ellenállást mutat a réteg két oldalán, amelyet mérni lehet (transzepiteliális elektrom Ohm/cm² ellenállás – TEER). Ez az ellenállás körülbelül 800 Ohm/cm².

A statisztikai értékeléshez párosított, kétmintás t-próbát (Student) használtunk.

2.3. 8-napos sorozatpasszálás hatása *Pseudomonas aeruginosa* és *Staphylococcus pseudintermedius* törzsekre szubletális koncentrációban alkalmazott marbofloxacin–gentamicin (1:1) kombinációjában, illetve marbofloxacin oldatban

16 kutyákból és macskákból izolált *P. aeruginosa* törzs érzékenységét vizsgáltunk marbofloxacin–gentamicin (1:1) kombinációban és marbofloxacin oldatban szubletális marbofloxacin koncentrációt alkalmazva. A vizsgálatok során MIC értékeket határoztunk meg, CLSI M07-A9 módszer szerint.

Napi MIC értékek meghatározása után a mikrotitrátor lemezen még szaporodást mutató inokulumokból átoltást végeztük előkészített, új mikrotitrátor lemezre, amelyekre felező hígítással marbofloxacin–gentamicin, illetve marbofloxacin oldatot vittünk fel, előzetesen. Ezt az átoltást végeztük el nyolc napon keresztül, miközben a törzsek MIC értékeit minden nap feljegyeztük.

A QRDR, valamint a fluorokinolon vagy aminoglikozid rezisztenciával kapcsolatos efflux szabályozó gének kimutatására *P. aeruginosa*-ban PCR-amplifikációt és szekvenálást végeztünk.

A karbonil-cianid-m-klór-fenil-hidrazon (CCCP) egy proton vezető molekula, amely megakadályozza a proton gradiens kialakulását és ezáltal akadályozza az elektron transzportot. A CCCP efflux pumpa gátlóként hat a *P. aeruginosa* törzsek esetében. A CCCP jól alkalmazható az efflux mechanizmusok jelenlétének igazolására.

A 8-napos passzálós kísérletet elvégeztük 32 kutyából és macskából izolált *S. pseudintrmedius* törzssel is.

A MIC értékek terdjét exponenciális függvény segítségével ellenőriztük.

2.4. *Staphylococcus* spp., *Streptococcus canis*, *Pseudomonas aeruginosa*, illetve *Malassezia pachydermatis* törzsek marbofloxacinnal és ketokonazollal szemben mutatott érzékenységi vizsgálatainak összehasonlítása 2010-ben és 2017—2018 között gyűjtött törzsekkel

2010-ben macska és kutya klinikai eseteiből gyűjtött 123 *Staphylococcus* spp., 37 *Streptococcus canis*, 52 *Pseudomonas aeruginosa* és 40 *Malassezia pachydermatis*, valamint 2017—2018 között, hasonló esetekből gyűjtött 89 *Staphylococcus* spp., 55 *Pseudomonas aeruginosa* és 80 *Malassezia pachydermatis* törzs MIC érzékenységi vizsgálatát végeztük el a különböző időpontokban nyert MIC értékek összehasonlításával.

2.5. *Malassezia pachydermatis* törzsek érzékenységének vizsgálata planktonikus és biofilm környezetben

8, külső hallójáratgyulladás és bőrgyulladás tüneteit mutató kutyákból izolált *Malassezia pachydermatis* törzset vizsgálatunk.

A *M. pachydermatis* törzseket Sabouraud táptalajban 48 órán át inkubáltuk, majd 3000 g-vel 10 percig centrifugáltuk. A gombákat steril fiziológiás sóoldattal mostuk, 3000 g-vel 10 percig centrifugáljuk, és fiziológiás sóoldatban reszuszpendáltuk. Kb. 10^6 CFU/ml-es szuszpenziót készítettünk 10-szeres hígítással. A szuszpenziót Sabouraud agar lemezekre oltottuk ki és az inkubációs idő lejárta után a telepszámokat CFU/ml-ben adtuk meg.

Biofilm kialakításához egyszerhasználatos, steril Foley katétert használtunk.

Biofilm forma előkészítés: 25 µl, 10⁶ CFU/ml élesztőszuspenziót csepegtetünk a katéter szegmenseinek felületére és 1 órán át 37 °C hőmérsékletű termosztátba helyeztük el (kapcsolási fázis), hogy elősegítsük az élesztőgombáknak a katéter felületéhez való tapadását. 1 óra elteltével ezeket a szegmenseket (a felszíni gombákkal együtt) 1 ml Sabouraud-tápközegbe merítettük, amelyek a különböző koncentrációjú ketokonazol oldatot is tartalmazta. A gomba szuszenziókat 37 ° C-on 72 órán keresztül inkubáltuk.

Planktonikus forma előkészítés: Ebben az esetben nem alkalmaztuk a kapcsolási fázist, a gombákat közvetlenül a ketokonazol különböző koncentrációit tartalmazó Sabouraud-táptalajba oltottuk. Így a szervezetek plankton formában maradtak.

A gomba-szuszenzió inkubálása 37 °C-on, 72 óráig történt.

A MIC értékek meghatározása mikrohígítási módszerrel történtek.

3. Eredmények

3.1. Marbofloxacin és gentamicin kombinációjának hatása *Pseudomonas aeruginosa* törzsek érzékenységére

Marbofloxacin és a gentamicin között szinergizmus került kimutatásra a vizsgált *P. aeruginosa* törzsek 48.5%-ában. Az átlagos FIC index 0,546, amely szinergiát, bár csak részleges szinergiát jelent a vizsgált törzsek átlagára nézve. A vizsgálatok alkalmával egyetlen törzs sem mutatott antagonistá hatást. Az eredmények alapján a marbofloxacin–gentamicin kombináció indokolt és célzott alkalmazása a *P. aeruginosa* által okozott külső hallójárat gyulladások esetében előnyösnek tűnik. Különösen előnyös lehet az alkalmazás olyan esetekben, amikor a magasabb hatóanyag koncentráció használata, a hallójárat és dobhártya sérülése miatt kockázatos lenne.

3.2. Gentamicin 1%-ban alkalmazott DMSO hatása egyrétegű sejtenyészeten integritására, illetve gentamicin egyrétegű sejtenyészeten való átjutására *in vitro* körülmények között

IPEC-J2 egyrétegű sejtenyészeten történő penetrációt vizsgálva, a gentamicin rossz paracelluláris permeációt mutat. Az 1%-os DMSO hozzáadása nem szüntette meg a paracelluláris integritást, és nem segítette elő a gentamicin sejtrétegen történő átjutását. Eredményeink azt mutatják, hogy a DMSO ilyen alacsony koncentrációban a gyógyszerkészítmény részeként nem segíti elő a gentamicin hámszöveten keresztül történő felszívódását és így nem fokozza a gentamicin által okozott ototoxikus hatások előfordulását a fülcseppekben sem. A HPLC módszerrel elvégzett vizsgálatunk az egyrétegű sejtenyészeten integritását mutatta, mivel nem növekedett meg a vizsgálat során a bazolaterális térben a gentamicin koncentráció.

3.3. 8-napos sorozatpasszálás hatása *Pseudomonas aeruginosa* és *Staphylococcus pseudintermedius* törzsekre szubletális koncentrációban alkalmazott marbofloxacin–gentamicin (1:1) kombinációjában, illetve marbofloxacin oldatban

A szubletális koncentrációkban alkalmazott marbofloxacin oldatban a sorozatos passzálás szignifikánsan megemelte a naponként mért MIC-értékeket. Szubletális koncentrációkban a marbofloxacin–gentamicin (1:1) MIC-értékek is növekedését mutattak, de ez a növekedés jóval alacsonyabb volt, mint a csak marbofloxacin oldatban mért érték. Egy törzs nem érte el a 32 µg/ml-nél magasabb MIC értéket.

A 8 napos sorozatpasszálást *S. pseudintermedius* baktériumokkal is végeztük. A MIC-ek átlagos növekedése a 8. napon a csak marbofloxacin oldatban tenyésztett törzseknél 11.67-szeres volt, szemben a marbofloxacin–gentamicin (1:1)

kombinációban tenyésztett törzsek 3.00-szoros értékével. Ezenkívül megállapítható, hogy a kombináció 1. napi eredménye is általában alacsonyabb volt, így a MIC növekedés mértéke is jóval kisebb mértékű abszolút növekedést mutatott. Az eredmények mindegyike kifejezett szignifikáns különbséget mutatott ($p < 0,0001$). Figyelembe véve az eredményeket, kimondhatjuk, hogy a marbofloxacin: gentamicin (1:1) kombináció jelentősen mértékben gátolhatja a *S. pseudintermedius* baktériumok fluorokinolonokkal szembeni rezisztenciájának kialakulását.

3.4. *Staphylococcus* spp., *Streptococcus canis*, *Pseudomonas aeruginosa*, illetve *Malassezia pachydermatis* törzsek marbofloxacinnal és ketokonazollal szemben mutatott érzékenységi vizsgálatainak összehasonlítása 2010-ben és 2017-2018 között gyűjtött törzsekkel

Az összehasonlítás során, sem a *Staphylococcus* spp., *Streptococcus canis* and *Pseudomonas aeruginosa* baktériumok marbofloxacinnal szemben, sem a *Malassezia pachydermatis* ketokonazollal szemben 2010-ben és 2017–2018 között mért MIC értékei között nem találtunk szignifikáns különbséget.

A vizsgált MIC értékek alapján a *Staphylococcus* spp. törzsek továbbra is nagyfokú érzékenységet mutattak marbofloxacinnal szemben. MIC₉₀, 0.25 µg/ml 2010-ben (n = 89), 1 µg/ml 2017–2018-ban (n=135). A második legérzékenyebb csoport a *Streptococcus canis*. volt. MIC₉₀ 2 µg/ml 2010-ben

(n=43), 2 µg/ml 2017–2018-ban (n = 22). Kiseb-
b érzékenységet mutatottak a *Pseudomonas*
aeruginosa törzsek, de az érzékenyég csökkenést ez
a csoport sem mutatott. (MIC₉₀ 8 µg/ml 2010-ben
(n=56), 4 µg/ml 2017–2018-ban (n=55).

A *Malassezia pachydermatis* 2010-ben és 2017–
2018-ban is nagymértékben mutatott érzékenységet
ketokonazollal szemben. MIC₉₀ 0.031 µg/ml 2010-
ben (n=54), 0,063 µg/ml 2017–2018-ban (n=80).

3.5. *Malassezia pachydermatis* törzsek érzékenységének vizsgálata planktonikus és biofilm környezetben

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a
Malassezia pachydermatis törzsek nagymértékben
érzékenyek ketokonazolra planktonikus állapotban.
Ugyanezeknek a törzsek az érzékenysége viszont
jelentős mértékben csökkent biofilm állapotban
tenyésztve. A kapott MIC értékek alapján biofilmben
a *Malassezia pachydermatis* érzékenysége 25–

3125-szor volt kisebb a planktonikus állapotban szaporodó törzsekhez képest.

4. Új tudományos eredmények

Marbofloxacin és gentamicin közötti szinergizmus kimutatása és leírása *Pseudomonas aeruginosa* baktériummal szemben.

Bebizonyítottuk, hogy gentamicinhez 1%-ban DMSO-t adva, az az IPEC-J2 egyrétegű sejtenyészet integritását nem bontja fel és a DMSO nem segíti elő a gentamicin sejtmembránon való átjutását.

8-napos sorozatpasszálás után kimutattuk, hogy a *Pseudomonas aeruginosa* és *Saphylococcus pseudintermedius* rezisztens törzsek előfordulási gyakorisága gentamicin és a marbofloxacin 1:1 arányú oldatát szubletális koncentrációban alkalmazva alacsonyabbak voltak, mint ugyanezek a

baktériumok rezisztens törzseinek arányai, csak szubletális marbofloxacin oldat-ban paszálva.

A staphylococcusok, a *Streptococcus canis*, a Marbofloxacin és a *Malassezia pachydermatis* ellenes *Pseudomonas aeruginosa* MIC értékei 2010 és 2017-2018 közötti időszakban ismét ketokonazolt tartalmaznak.

2010-ben és 2017-2018 között gyűjtött *Staphylococcus* spp., *Streptococcus canis*, *Pseudomonas aeruginosa*, illetve *Malassezia pachydermatis* törzsek MIC értékei között nem találtunk szignifikáns különbséget marbofloxcinnal, illetve ketokonazollal szemben.

Kutyák, klinikai beteganyagaiból gyűjtött *Malassezia pachydermatis* törzsekkel elvégzett érzékenységi vizsgálatok során a MIC értékek 25–3125-szo voltak alacsonyabbak biofilmben, mint planktonikus állapotban.

5. Szerzői publikációk

5.1. Eredeti közlemények

Gyetvai B., Jerzsele Á., Pászti-Gere E., Nagy G., Gálfi P.: Gentamicin sulphate permeation through porcine intestinal epithelial cell monolayer. *Acta Veterinaria Hungarica* 63 (1), pp. 60–68 2015.

El Zowalaty ME., Gyetvai B.: Effectiveness of Antipseudomonal Antibiotics and Mechanisms of Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* *Polish Journal of Microbiology* 65:(1) 23-32. 2016.

Jerzsele Á., Albrecht V., Palócz O., Gálfi P., Gyetvai B.: A biofilmképzés hatása antibiotikumokkal szembeni *in vitro* érzékenységre kutyából izolált *Pseudomonas aeruginosa* törzseknél. *Magyar Állatorvosok Lapja* 137:(1) 45-52. 2013.

Jerzsele Á., Balázs B., Kálmánfi E., Lajos Z., Gálfi P., Gyetvai B.: Kutyából és macskából izolált *Malassezia pachydermatis* törzsek *in vitro* érzékenységi vizsgálata. Magyar Állatorvosok Lapja 135. 351-356. 2013.

Jerzsele Á., Balázs B., Lajos Z., Gálfi P., Gyetvai B.: Külsőhallójárat-gyulladásban szenvedő kutyákból izolált *Pseudomonas aeruginosa* törzsek *in vitro* érzékenységi vizsgálata. Magyar Állatorvosok Lapja 135:(12) 746-750. 2013.

Jerzsele Á., Gyetvai B., Csere I., Gálfi P.: Biofilm formation in *Malassezia pachydermatis* strains isolated from dogs decreases susceptibility to ketoconazole and itraconazole. Acta Veterinaria Hungarica 62 (4), 473–480 2014.

5.2. Konferencia előadások

Gyetvai B., Csere I., Szaniszló F., Lang Zs., Gálfi P., Csikó Gy.: Marbofloxacin és ketokonazol hatóanyag tartalmú készítmények hatékonyságának vizsgálata pozitív kontrollkészítménnyel szemben. Akadémiai Beszámolók 2013.

Gyetvai B., Jerzsele Á., Lang Zs., Gálfi P.: *Staphylococcus* spp. és *Pseudomonas aeruginosa* törzsek 8-napos sorozatpasszálásának hatása szubletálisan alkalmazott marbofloxacinnal, illetve marbofloxacin-gentamicin kombinációval szembeni rezisztencia kialakulására. Akadémiai Beszámolók 2014.

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Gálfi Péter professzor úrnak, témavezetőmnek és Dr. Jerzsele Ákos docens úrnak, társtémavezetőmnek, hasznos tanácsaikért, javaslataikért, iránymutatásukért, amellyel munkámat végig nyomon követték és segítették.

Köszönettel tartozom Dr. Móré Attila elnök úrnak, aki hozzájárult, hogy PhD képzésen részt vehessek.

Külön köszönet illeti a DUO-BAKT Mikrobiológiai Laboratóriumot, Dr. Lajos Zoltán laboratóriumvezetőt és munkatársait, akik biztosították a vizsgálatok elvégzéséhez szükséges mikroba törzseket. Nélkülük ez a tanulmány nem készülhetett volna el.

Végül, de nem utolsó sorban hálás köszönettel tartozom feleségemnek, Dr. Kellner Viola Zsuzsannának, és gyermekeimnek Krisztinának és Andrásnak, végtelen türelmükért, amellyel elviselék még akkor is, amikor alig voltam elviselhető.