

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi kar
Patológiai Tanszék

Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok
importált díszhalakból izolált
baktériumokon

Készítette: Klébert Gergely
végzős hallgató

Témavezető: Dr. Baska Ferenc

Budapest, 2014.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	- 2 -
2. Irodalmi összefoglaló.....	- 3 -
3. Anyag és módszer.....	- 13 -
3.1. A minták eredete.....	- 13 -
3.1.1. Halak vizsgálata, a boncolás menete	- 13 -
3.2. Baktériumok izolálása, tenyésztése	- 14 -
3.3. Fénymikroszkópos vizsgálat.....	- 18 -
3.4. Preparátum jelölés	- 19 -
3.5. Bakteriális anyagcsere vizsgálatok	- 19 -
3.6. Rezisztencia vizsgálat.....	- 22 -
4. Eredmények	- 24 -
4.1. Izolált baktériumok.....	- 24 -
4.1.1. A Baktériumok anyagcsere vizsgálata	- 24 -
4.2. Betegségek.....	- 25 -
4.2.1. Guppi myxobacteriózisa, flavobacteriózisa: Guppi-betegség	- 25 -
4.2.2. Halak szeptikémiájáról általában.....	- 25 -
4.2.3 Gyrodactylosis - hámférgesség	- 26 -
4.2.4 Trichodina csillósok	- 26 -
4.3. Rezisztogram	- 27 -
4.3.1. Mintáink rezisztogramja (Patológiai tanszéken)	- 27 -
4.3.2. Mintáink rezisztogramja (Mikrobiológiai tanszéken végzett laboratóriumi körülmények között).....	- 27 -
4.3.3. Mintáinkból meghatározott baktériumok faji szintű felsorolása	- 30 -
5. Megbeszélés.....	- 34 -
6. Összefoglalás	- 35 -
7. Summary.....	- 36 -
8. Szakirodalom.....	- 37 -
9. Köszönetnyilvánítás.....	- 39 -

1. Bevezetés

Hazánkban egyre nagyobb teret kap, ha csak nem mára már egyeduralkodóvá vált a hazai akvarisztikai piac a szomszédos országokból és Ázsiából importált halakkal való ellátása. Az általam vizsgált halak eredetüket tekintve Sri Lankáról és Thaiföldről származtak. A külföldi szállítmányokkal a legtöbb esetben nem csak halakat importálunk a hazai akvarisztikába, hanem általában a betegségeket is. A patogén és fakultatív patogén kórokozók a stresszes, néha hosszan tartó szállítás során legyengült, kimerült halak szervezetét könnyebben támadják meg és szaporodnak el a halakon, s ezen példányokat mintegy kiinduló pontnak használva terjednek szét a hazai akvarisztikai állományokban. A leggyakrabban a hurcolt betegség csak az otthoni akváriumokban bukkan csak fel, mivel a kereskedők vagy tudatlanságból nem ismerik fel, vagy pusztán üzleti érdekből, az esetleges veszteségektől eltekintve nem lépnek fel hatásosan a kórokkal szemben. Így, a védekezés és a kezelés az otthoni haltartókra hárul. Ezen indítatásból is választottam ezt a szakdolgozati témát, hogy az e téren már előre sejtett állapotokat bizonyítva, majd vizsgálva lehetőség szerint hasznos segítséget nyújtsunk ebben a témában mind a trópusi akvarisztikai mind a kerti hal tartók számára.

A vizsgálatokat friss 'érintetlen' mintákból közvetlenül a megérkezésüket követően, a szállítmányok felnyitása során sikerül beszerezni, ezért véleményem szerint ezek a minták megfelelően reprezentálják a halak állapotát.

Az alapvető és elsődleges vizsgálatainkat az Állatorvosi Egyetem Patológiai Tanszékén, majd a további labor specifikus vizsgálatokat az egykori Magyar Királyi Bakteriológiai Intézetben az egyetem Járványtani és Mikrobiológiai tanszékén végeztem.

A mintákból kitenyésztett baktériumnál az ellenük használt antibiotikumokkal szembeni és az előzményekből ismert nagyfokú rezisztenciát szerettem volna igazolni, vagy cáfolni. Az orvoslás más területein is fokozatosan kialakuló, egyre nagyobb problémát jelent az antibiotikum rezisztenciára. A hozzá nem értők legtöbb esetben a gyógyszer hatástalanságát a mennyiségével próbálják ellensúlyozni, ami esetleges étkezési célra tartott, vagy befogott és kezelt halak esetében növeli a reziduum mennyiségét a piacra szánt halhúsban. Ezen túlmenően az élelmiszer egészségügyi várakozási idő kitolódásának figyelmen kívül hagyásával is tovább növekszik a humán közegészségügyi kockázat.

2. Irodalmi összefoglaló

Ma már a szakkönyvek és szakcikkek formájában bőségesen áll rendelkezésre szakirodalom a halakban előforduló, megbetegedéseket okozó baktériumok rendszertanáról, tenyésztéséről, valamint a gyógykezelések lehetőségéről, problematikájáról.

Az egyik leghasznosabb forrás az Inglis és mtsai (1993) által szerkesztett, az édesvízi halak baktériumos betegségeiről írt szakkönyv, mely rendszertani beosztás szerinti felsorolásban tárgyalja a különböző baktériumcsaládba tartozó patogén, fakultatív patogén és szaprofita fajok morfológiai, biokémiai, tenyésztési és gyógyszer-érzékenységi jellemzőit.

Az egyik legrégebbi idők óta ismert hasvízkór okozójaként Schäperclaus egy baktérium törzset jelölt meg, de ma már tudjuk, hogy az elsődleges kórokozó egy vírus és az *Aeromonas hydrophila* csak ehhez társul. A baktériumok okozta vérzéses szeptikémiát (*Septicemia haemorrhagica*) csillós *Aeromonas*ok, vagy más Gram-negatív baktériumok okozzák, amely megbetegedés különösen jellemző a pontyfélékre és a harcsákra. A csillós *Aeromonas*ok okozta szeptikémia tünetei: vérzések, amik lehetnek felületesek a bőrfekélyeknél, vagy a hasüreg parenchimás szerveiben. E betegségre is, mint általában a halak megbetegedésére nagyban hajlamosít a leromlott rossz vízminőség, az anyagcsere termékek feldúsulása.

A hasúri folyadék felhalmozódás lehet víztiszta, vagy vörhenyes, de a legjellemzőbb a bővérűség, a vérzések a szervekben valamint a hashártya alatt és a bélfodorban. A szervek között fibrines összetapadások is gyakran előfordulhatnak. A lép megnagyobbodott, lekerekedett és cseresznye piros. A megnagyobbodott vesékben gyakran *colliquatio necrosis* található. Izom elhalás szintén lehetséges, de ez ritkán terjed mélyre, inkább csak felületes és a fekélyekkel van összefüggésben. Ugyancsak *A. hydrophila*-t lehet izolálni az úszórothadás esetén. Az úszókon és a farkon barnás színű elhalás van, az úszók alapján idült vérzéses fekélyek láthatók illetve bővérűség a bőr alatti erekben. *A. hydrophila*, vagy *A. sobria* baktériumokat lehet kimutatni a pikkely ödéma nevű betegség esetén is. A hátsó test fél bővérűsége és a pikkelyek borzaltsága figyelhető meg. Azt, hogy milyen gyógyszereket használnak az *A. hydrophila* fertőzések ellen függ a körülményektől,

a nemzeti szabályoktól, a beszerezhetőségtől. (Fijan 1967) klóramfenikolt és nifurpirinolt használt, (Meyer 1964) oxitetraciklint, (Seaman 1951) szulfamerazint. A fő gond az *Aeromonas hydrophila* elleni antibiotikus kezeléssel, a többi bakteriális kezeléshez hasonlóan, hogy igen könnyen rezisztencia alakul ki a használt antibiotikum ellen (Mitchell és Plumb 1980; Aoki és Egusa 1971).

Megelőzés: a halastavak, tenyésztő medencék leengedése és fertőtlenítése a lehalászás után. A számtalan szerotípus miatt nem valószínű, hogy valaha is hatékony vakcinát sikerülne kifejleszteni ellene. A hangsúlyt a megelőzésre, hajlamosító tényezők megszüntetésére, mérséklésére kell helyezni. Mivel a csillós *Aeromonas*ok ubiquiter kórokozó, nincs értelme antibiotikumokkal kezelni a betegséget, sőt az *Aeromonas* fertőzések kezelésére alkalmazott antibiotikumok legtöbbje ellen már leírtak rezisztens tenyészeteket (Ansary és mtsai, 1991, Chang és Bolton 1987), ahol a rezisztenciáért átadható R-plazmidok felelősek. Szintén R-plazmidok által hordozott rezisztenciával foglalkozott (Hedges és mtsai, 1985; Aoki és mtsai, 1986).

Baktérium rezisztenciáról általában

Az antibiotikumok alkalmazásánál elengedhetetlen a baktériumok érzékenységének és rezisztenciájának ismerete. (Semjén, 1998) Az egyes baktérium speciesek különböző mértékben érzékenyek a baktériumellenes szerekkel szemben, de azonos speciesen belül a különböző törzsek, sőt egy baktériumpopulációban egyes variánsok antibiotikum-érzékenysége is eltérő lehet. Az antibakteriális szerek hatékonyságát alapvetően az befolyásolja, hogy a kórokozó érzékeny vagy rezisztens a választott szerrel szemben. A rezisztencia lehet elsődleges vagy másodlagos.

Az elsődleges (természetes) rezisztencia azt jelenti, hogy egyes baktériumfajok természetükénél fogva érzéketlenek bizonyos antibiotikumokkal szemben. Az egyes kemoterápiás szerek eltérő hatásspektruma a baktériumok természetes rezisztenciájával kapcsolatos.

A másodlagos rezisztencia az addig érzékeny baktériumfajon belül rezisztens törzsek kialakulását jelenti. A szerzett rezisztencia genetikai alapja mutáció vagy az ún. transzferálható rezisztencia felvétele, amely történhet transzformációval, transzdukcióval vagy konjugációval. A szerzett rezisztencia az antibiotikumok használatából eredő „szelektív nyomás” révén terjed, és különösen gyors lehet plazmid átvitel esetén. Ezért

klinikai szempontból a legnagyobb jelentősége a plazmidok (R-faktorok) útján terjedő transzfer vagy infekciós rezisztenciának van. (Schmidt és mtsai, 2001)

A mutáció révén kialakult rezisztencia mértéke változó lehet. A sztreptomicinnel szemben egy pontmutáció teljes rezisztenciát hozhat létre, ezt nevezzük *egylépcsős rezisztenciának*. A fluorokinolonokkal szemben a rezisztencia fokozatosan alakul ki (többlépcsős rezisztencia). A szerzett rezisztencia genetikai információja a következő biokémiai folyamatokban fejeződik ki:

- A/ Megváltozhat a baktérium sejtfalának permeabilitása vagy az antibiotikumnak a sejtfalon keresztül való transzportja, így lehetetlenné válik az antibiotikum bejutása a baktériumsejtbe (pl. klóramfenikol, tetraciklinek esetében illetve a szulfonamidok ellen is részben így „védekezik” a baktérium).
- B/ A baktérium anyagcsereje módosul úgy, hogy alternatív metabolikus út kialakulásával, vagy a lényeges metabolit termelésének növelésével győzi le a baktérium a kemoterapeutikum kompetitív gátlását (pl. szulfonamidok esetében).
- C/ Az antibakteriális hatás létrejöttéhez szükséges kötőhely módosulása, aminek eredményeként az antibiotikum nem kötődik a receptorhoz (pl. a riboszóma fehérje megváltozása a sztreptomicinrezisztencia esetében).
- D/ Olyan enzimek termelése, melyek elbontják vagy inaktíválják az antibiotikumot (pl. béta-laktamázok).

Ha ugyanazon baktériumtörzs többféle antibakteriális szerrel szemben ellenálló, akkor *polirezisztenciáról* beszélünk. *Keresztrezisztencián* azt értjük, ha valamely antibiotikum ellen kialakult rezisztencia egyben a baktériumtörzs más kemoterapeutikummal szembeni ellenállást is jelent. Többnyire hasonló felépítésű vagy hatásmechanizmusú készítményekkel kapcsolatos.

A hal-patogén baktériumok széles körben elterjedt rezisztenciával rendelkeznek sok általánosan használt antibiotikummal szemben. Richards és mtsai (1992) szerint tovább súlyosbítja a problémát, hogy a baktériumok képesek átadni közvetlenül egymásnak rezisztenciát kódoló géneket, így többszörösen rezisztens baktérium törzsek alakulhatnak ki. Bár mindeddig nem találtak arra bizonyítékot, hogy ezen antibiotikumoknak halakon történő alkalmazása fokozná az emberi patogén baktériumok rezisztenciáját ugyanezen

antibiotikumokkal szemben. Ennek ellenére a rezisztencia átvitelének kockázata elméletileg lehetséges Hedges és mtsai (1985) szerint ott, ahol rezisztenciát kódoló plazmidot hordozó hal baktériumok humán kórokozókkal (pl. enterobaktériumokkal) érintkeznek a vízi környezetben.

Kiürülés dinamikai vizsgálatokkal állapítható meg, hogy egy gyógyszer adagolásának befejezése után mennyi időre van szükség ahhoz, hogy a reziduum szintje statisztikailag nagy biztonsággal az MRL értéke alá csökkenjen. Azt az időt, amely alatt ez a kívánalom megvalósul, nevezzük élelmezés-egészségügyi várakozási időnek. A vizsgálatok elvégzése a gyógyszergyárak feladata, az MRL és a várakozási idő megállapítása hatósági feladat. Halhús esetében az élelmezés-egészségügyi várakozási idő legkevesebb 500 napfok, ha az állatorvos másként nem rendeli (Biró, 1993; G. Vivekanandhan, mtsai, 2002)

A vizsgálatainknál használt antibiotikus szerek:

A szakirodalomban bőséges adat áll rendelkezésre a napjainkban alkalmazott antibiotikumokról és kemoterápiás szerekről. Az alábbiakban az általunk felhasznált antibiotikum és kemoterápiás szerek rövid leírása következik

Amoxicillin

Széles spektrumú, baktericid hatású, fél szintetikus aminopenicillin származék. Antibakteriális hatását a baktériumok sejtfalszintézisének gátlása révén fejt ki. A szerkezetileg ugyanebbe a csoportba tartozó ampicillinnél kedvezőbb farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkezik, amely a para helyzetű hidroxil csoportjának köszönhető. Antimikrobiális hatása hasonló az ampicillinéhez. E szer hatékonyságának vizsgálatához a standard korong diffúziós módszert használják legtöbbször. Az amoxicillint gyakran kombinálják klavulánsavval, egy béta-laktamáz inhibitorral. Ezzel kivédhető a béta-laktamáz okozta rezisztencia, és a gyógyszer több Gram-negatív organizmus ellen lesz hatásos. (Semjén, 1998)

Amplicillin

Fél szintetikus penicillin (béta-laktám antibiotikum), amely baktericid, illetve bakteriosztatikus hatású. Mint béta-laktám antibiotikum, penicillinkötő fehérjékhez kapcsolódva inaktiválja a baktériumsejtfal felépítésében szerepet játszó peptidázokat. Főképp Gram-pozítív, de néhány Gram-negatív baktérium fehérjeburokkal védett membránján is át tud hatolni. Ezzel hatásspektruma szélesebb, mint a penicilliné. (Semjén, 1998)

Cephalexin

Első generációs Cephalosporin-ok csoportjába tartozó fél szintetikus antibiotikum. Fő hatását a bakteriális sejtek osztódásakor a sejtfalszintézis enzimeinek gátlásával éri el. (Semjén, 1998)

Ciprofloxacin

Egy szintetikus, a fluorokinolonok családjába tartozó antibiotikum. A ciprofloxacin baktericid hatást fejt ki a baktériumok szaporodási fázisára azáltal, hogy gátolja a bakteriális DNS-giráz (topoizomeráz) enzimet. Ezen enzim gátlásával lehetetlenné válik a DNS replikáció valamint az átírás, transzláció is, így a baktérium nem képes a szaporodásra és a fehérjeszintézise is megszűnik. A fluorokinolon antibiotikumok 100-szor szelektívebbek a bakteriális DNS-giráz enzimre, mint a gazdaszervezet enzimére.

A fluorokinolon-karbonsav antibiotikumokat – így a ciprofloxacint is – széles antibakteriális hatásuk, speciális támadáspontjuk valamint az alacsony bakteriális rezisztencia miatt széles körben alkalmazzák. (Semjén, 1998)

Clindamycin

Fél szintetikus antibiotikum, a baktérium proteinszintézisét gátolja a riboszóma 50S alegységéhez kötődése révén. Az antibiotikum koncentrációjától és a mikroorganizmus érzékenységétől függően bakteriosztatikus vagy baktericid hatású lehet. Külsőleg és belsőleg egyaránt alkalmazható. Főként Gram-pozítív baktériumok, és néhány érzékeny anaerob törzs ellen hatékony. Első sorban bakteriosztatikus hatással bír, ezért a kezelés időtartama rendkívül fontos e szer esetében, hogy a gyógyszer koncentráció mennyi ideig

van a MIC (Minimum Inhibitory Concentration) felett. A klindamicinnel szembeni rezisztencia kialakulásának elve az, hogy a metil-csoportok erősebben kötődnek a 23S rRNS-hez (úgynevezett konstitutív MLSB típusú rezisztencia), aminek hatására a klindamicin sokkal kevésbé képes kötődni a riboszómához. (Semjén, 1998)

Doxycyclin

A Tetracyclinek csoportjába tartozó antibiotikum. Széles hatás spektrummal bír Gram-pozitív és -negatív baktériumokra és a sejtfa nélküli mikroorganizmusokra. (*Plasmodium* sp.) Elsősorban bakteriosztatikus, fehérje szintézis gátló hatását az 30S riboszómán fejt ki. (Semjén, 1998)

Enrofloxacin

Az enrofloxacin a fluorokinolonok csoportjába tartozó szintetikus antibiotikum. Antibakteriális hatása a baktériumok gyráz enzimjének gátlásán alapszik. A Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokkal és a Chlamydiák-kal szemben baktericid hatású. (Semjén, 1998)

Erythromicin

A makrolidok csoportjába tartozó antibiotikum. A bakteriális riboszóma 50S alegységéhez kötődve gátolja a rá érzékeny baktériumok fehérjeszintézisét. Koncentrációjától függően bakteriosztatikus, illetve baktericid hatású. Alkalmas néhány protozoon fertőzés kezelésére is. Nem hat a Gram-negatív bélbaktériumok többségére és nem fermentálható Gram-negatív baktériumokra. (*Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp.) (Semjén, 1998)

Florfenicol

Széles spektrumú antibiotikum mind a Gram-pozitív mind a Gram-negatív baktériumok többségére hatásos. vízben kevésbé zsírokban jól oldódik. Hatását a fehérje szintézisre a riboszómák peptidyltranszferáz-án fejt ki. Az eukaryota sejtekre is hatással van. (Semjén, 1998)

Kanamycin

Aminoglikozidok csoportjába tartozó (*Streptomyces kanamyceticus*) által termelt antibiotikus vegyület csoport. *Pseudomonas aureginosa* ellen kifejezetten és Gram-negatív baktériumok ellen hatékony. Támadás pontja a fehérje szintézis gátlása a 30S-riboszómán. (Semjén, 1998)

Metronidazol

Erős baktericid hatással rendelkezik első sorban az anaerob baktériumokkal és protozoonokkal szemben, a bakteriális DNS károsítása révén. A metronidazol molekula áthatol a baktérium sejtfalán és nitro-csoportja intracellulárisan redukálódik, valószínűleg hidroxilaminná alakul. A metronidazol nitrocsoportjának redukciója során citotoxikus intermedierek képződnek, amelyek kovalensen kötődnek a baktériumok DNS-éhez és gátolják az anaerob kórokozók nukleinsav szintézisét, így a sejt DNS szintézise megszűnik, mely egyben a sejt pusztulását is jelenti. Közel valamennyi obligát anaerobbal szemben hatékony (kiv. *Propioni* bakt., *Actinomycetes*). Kombinációban hatékony néhány fakultatív anaerobra, valamint néhány spirochetára is. Hatás spektruma kiterjed Gram-pozitív és negatív baktériumokra. (Semjén, 1998)

Neomycin

A neomicin is egy baktericid aminoglikozid antibiotikum, a *Streptomyces fradiae* termeli. Stabil bázis, vízben jól oldódik, semleges és alkalikus közegben rendkívül stabil. A riboszóma 30 S és 50 S alegységéhez egyaránt kötődik. Elsősorban a fehérjeszintézis elongációs fázisát gátolja és a baktérium sejtmembránját is károsítja. Hatásspektruma a sztreptomicinéhoz hasonló. Keresztrezisztenciát mutat gyakran sztreptomicinnel és kanamicinnel. (Semjén, 1998)

Nitrofurantoin

Ez egy szintetikus antibiotikum meglehetősen széles bakteriális spektrummal. (*Staphylococcus*, *Eshericia*, *Klebsiella*) A bakteriális sejtekbe sokkal gyorsabban jut be mint a gazda sejtekbe. Hatása a baktériumra meglehetősen egyedi és komplex. A bakteriális DNS károsításával megakadályozza a flavoproteinek szintézisét, ami a sejt belüli antibiotikum lebontásért lenne felelős.

Továbbá támadja a riboszómákat, a DNS-t, a sejt légzést, a piruát metabolizmusát is. Ezen kívül még további sejten belüli funkcióit sejtik a kutatók. (Semjén, 1998)

OTC

Az oxitetraciklin a *Streptomyces rimosus* terméke, a tetraciklin fél szintetikus származék. Sói vízben jól oldódnak, alkalikus közegben gyorsan, savas közegben lassan bomlanak. Hatásmechanizmusukat a riboszóma 30 S alegységéhez és a mRNS-hez kapcsolódva fejtik ki, a fehérjeszintézist gátolják, hatásuk bakteriosztatikus. Aktív transzporttal jutnak át az érzékeny baktériumok citoplazma membránján. Hatásspektrumuk rendkívül széles, hatékonyak a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok széles körére. Az egyes tetraciklinek spektruma és *in vitro* hatékonysága lényegében azonos. A rezisztencia viszonylag lassan (többlépcsős típusú) alakul ki velük szemben, és rendszerint az aktív transzport zavarán, azaz a sejtmembrán átteresztőképességének csökkenésén alapul. (Samuelsen, mtsai. (1992) Mivel a rezisztencia genetikailag R-plazidhoz kötött, hajlamos a gyors terjedésre, amit a tetraciklinek széles körű alkalmazása is sajnos elősegít. Adott területen a kialakult rezisztencia hosszú ideig megmarad. A tetraciklinek között keresztrezisztencia van. Halak furunkulosisa, pontyok tavaszi viraemiája során kialakuló másodlagos baktériumos fertőzések megelőzésére takarmányba keverve adhatjuk. (Semjén, 1998)

Penicillin

A penicillin elnevezés a β -laktám antibiotikumok egy csoportját jelenti, amelyeket az erre érzékeny, rendszerint Gram-pozitív baktériumok által ellen használnak.

Hatása a baktériumok sejtfalában a peptidoglikánok közötti keresztkötések kialakulásának gátlása. A penicillin β -laktám része ahhoz a transzpeptidáz enzimhez kötődik, amely a baktérium peptidoglikán molekuláit kötné össze. Az enzim így nem tud megfelelően működni és a baktérium sejtfa osztódás során elveszti funkcióját, a baktérium citolízist szenved. Ezen felül a felhalmozódott peptidoglikán prekursorok a baktériumban aktiválják a sejtfa hidrolázok működését, amelyek tovább bontják a baktérium meglévő peptidoglikánját. (Semjén, 1998)

SXT (Sulfametoxazol-trimethoprim)

A szulfonamidok enyhén savas karakterű, vízben rosszul oldódó amfoter anyagok. Hatásmechanizmusuk lényege, hogy meggátolják a baktériumok folsavszintézisét, ugyanis a para-amino-benzoésav (PABA) kompetitív antagonistái. Hatásuk bakteriosztatikus. A szulfonamidok hatásspektruma lényegében azonos. Érzékenyek iránta a Gram-pozitív coccusok és néhány pálca, egyes anaerobok és számos Gram-negatív baktérium is. Gyakori irántuk a szerzett rezisztencia, mely rendszerint a megnövekedett PABA-szintézis eredménye. A szulfametoxazol a szisztémás szulfonamidok csoportjába tartozik, hatás tartamát tekintve közepes hatású. (Semjén, 1998)

A trimetoprim (TMP) egy diaminopirimidin, amely kifejezetten potencionálja a szulfonamidok hatékonyságát. Zsír oldékony vegyület, vízben alig oldódik. A TMP bakteriosztatikus hatását a dihidro-folsav-reduktáz enzim gátlása révén fejt ki. A TMP hatékony a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok széles körével szemben. Mutáció révén kromoszómális és R_faktor által közvetítetten, viszonylag lassan terjedő rezisztencia egyaránt kialakulhat, mely többnyire együtt jár a szulfonamid-rezisztenciával is. Önmagában csak elvétve alkalmazzák. (Inglis mtsai, 1995)

A szulfonamidokat és a diaminopirimidineket együtt alkalmazva hatásuk baktericiddé válik, és az antibakteriális spektrum is kiszélesedik. További előnye a kombinációnak, hogy áttöri a szulfonamid-rezisztenciát és viszonylag kisebb adagban is hatásos.

A dísz- és haszonhalon végzett baktériumellenes gyógykezelések a mindennapi tógazdasági és akvarista gyakorlatban meglehetősen elterjedtek. Etetéssel a halakba juttatva általában 40-60 mg/ttkg dózisban érhetjük el az antibakteriális kezeléstől várt hatást, ami a legtöbb halfaj esetében kb. 0.1 %-os tápnak felel meg. Elengedhetetlen szempont a kezelés legalább 5-7 napon át való végzése, mivel a kezelés rövidebb időtartama nem hozza meg a várt hatást, valamint hozzájárul a rezisztencia gyorsabb kialakulásához (Roberts, 1993). A díszhal praxisban mérvadó Bassleer (1997) az akváriumokban a tartós fürösztés (1.5 – 2 g/100 liter 4-5 napig) módszerét ajánlja, míg nagyobb testű díszhalaknál (koi, tenyész anyák, aranyhal, diszkoszhal, nagyobb sügerek) az intraperitoneális és intramuszkuláris injektálás retard hatású készítményekkel, szintén 40-60 mg/ttkg/nap dózisban lehet eredményes.

A mai magyar halas bakteriológia tudományát szinte kizárólag a budapesti állategészségügyi intézetben (ÁDI-NÉBIH) Halkórtani és Méhegészségügyi részlegében művelik. Korábban a szarvasi Haltenyésztési Kutatóintézetben (HAKI-ban) a nyolcvanas évek végéig volt bakteriológiai kutatás, de ez az irányzat sajnos azóta megszűnt, inkább csak vízélettani laborokban, illetve a tihanyi MTA Balatoni Limnológiai Kutató Intézetben folyik vízélettani-bakteriológiai kutatás, melyek keretében főleg a kéalgák és szaprofita baktériumok vízélettani jelentőségével foglalkoznak.

3. Anyag és módszer

3.1. A minták eredete

A szállítmányok egymástól szeparáltan termo-csomagolásban egyenes úton repülővel, majd futárral szállítva Sri Lankáról és Thaiföldről érkeztek a nagykereskedőhöz, az érdi TRIOKER Kft.-hez aki készségesen bocsájtotta rendelkezésünkre a vizsgálatokhoz szükséges halminta mennyiségét.

Az frissen érkezett szállítmányokból, a felnyitással egy időben igyekeztem a legyengült, estelegesen már elváltozásokat mutató egyedeket begyűjteni, az esetlegesen elhullott egyedekkel egyetemben, ám ezeket külön kezelve és csomagolva jutattam el a további vizsgálatok helyszínére. Az első pillantásra hibátlan tételekből az érkeztető medencébe való behelyezés után vettük ki az elváltozást mutató példányokat.

3.1.1. Halak vizsgálata, a boncolás menete

Az így kiválogatott egyedeket lehetőség szerint frissített saját vizükben egyesével, de minden esetben csomagonként szétválasztva, nylon zacskóba oxigénnel dúsított levegővel csomagolva, a hőmérséklet megtartása végett hűtőtáskában szállítottuk tovább.

A tetemek, és a még élő egyedek boncolását a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Kar Patológiai Tanszékének halkórtani laboratóriumában végeztük el. A mintákat igyekeztünk a lehetőségekhez mérten leghamarabb feldolgozni, így az élő állatok a boncolásig semmiféle egyéb beavatkozást nem igényeltek.

A vizsgálatra szánt élő állatokat az általános külső vizsgálatot követően fejre mért határozott ütéssel kábítottuk el, majd a fej mögött a gerinc átvágásával extermináltuk. A vágó eszközt minden hal között a gázégőben hevítettük, ezzel akadályozva meg az egymást követő minták egymás általi mikrobiológia beszennyeződését. Ezt követte a belső vizsgálat.

Az így előkészített halak kopolyú fedele alól előzőleg gázlángban vörös izzásig hevített, majd visszahűtött, és ez által sterilizált hegyes végű, bakteriológiai oltó kaccsal a kopolyút magát kissé elroncsolva véres mintát vettünk a további bakteriológia

vizsgálatokhoz. Ez a fajta mintavételi mód megfelelően reprezentálja magában a halban, a halon, és közvetlen környezetében élő baktérium és mikroorganizmus flórát. Jóllehet ezen eljárás eltérő a megszokott, melegvérű emlősökből való mintavételi eljárástól, mégis esetünkben megbízható eredményt szolgáltat a vizsgálandó területről.

Ezután a hasüreget megnyitva az ott található esetleges fiziológiai állapottól való eltéréseket a boncolási naplóba rögzítettük, majd a tetemet formaldehid vizes oldatába helyezve tartósítottuk a további vizsgálatokhoz. A néhány esetben a nemek meghatározása is ekkor történt, ha az külső jegyek alapján korábban még nem volt eldönthető.

3.2. Baktériumok izolálása, tenyésztése

A bakteriológiai vizsgálatok során két vizsgálati módszert is elvégeztünk. Az egyik gyors, a mindennapi hal-állatorvoslásban használható módszer, a másik az ok-feltáró idő igényes laboratóriumi vizsgálatok voltak.

A boncolás során steril oltókaccsal a kopolyú elroncsolásával vett véres bakteriológiai mintákat véres-agarra oltva primer tenyészetet készítettünk. A tenyészeteket egyedi azonosítóval láttuk el. A minták inkubációját szigorúan szoba hőmérsékleten, 18-25C° fokon végeztük, ezzel mintegy az élő halhoz hasonló környezetet teremtve a baktériumok számára. Az inkubációs idő legtöbbször két nap volt, ami alatt szép különálló telepek fejlődtek a véres-agaron.

A) A praxis orientál kevésbé precíz, ámbár gyors a halak kezelésben használható, bakteriológiai rezisztencia vizsgálatot ezt követően végeztük el. Ehhez a vegyes tenyészetet felhasználva azt a Müller-Hinton agaron megszélesztve, a leggyakrabban használt antibiotikum-korongokat helyeztük el a Petri csészében. 24 órás szobahőmérsékleten való inkubációt követően értékelhető eredményt kaptunk a vegyes kultúra antibiotikum érzékenységéről.

B) A primer vegyes tenyészeinkből kiválasztott, érdekesebbnek tűnő mintáinkat az egyetem Járványtani és Mikrobiológiai tanszékére szállítottam a további vizsgálatok elvégzése céljából. Az intézetben a vegyes baktérium tenyészeinkből, többszöri átoltással szintenyészeteket készítettünk, hisz ez alapvető feltétele volt a további tesztek, és későbbi

baktérium-faj, illetve -család meghatározásának. Mivel több esetben is vizsgálatainkhoz friss tenyészetekre volt szükség ezért mintáinkat 2-3 naponta oltottuk át friss táptalajra. A baktériumok tartását és tenyésztését a legtöbb esetben véres agaron végeztük, kivéve az antibiotikum rezisztencia vizsgálatokat, amikhez Müller-Hinton féle agart használtunk. A normál inkubációt szoba hőmérsékleten 20-25C°, alumínium fóliába csomagoltan végeztük. Ettől eltérő hőmérsékletet csak a minták tárolásához és az antibiotikum rezisztencia vizsgálatához használtunk. A tárolást normál hűtőszekrényben alumínium fóliába csomagoltan végeztük. A rezisztencia vizsgálatokhoz inkubátort vettünk igénybe a vizsgálat standardizálása végett. Továbbá a faj meghatározás céljából vizsgált baktériumainkat a vizsgálatok befejeztével -80 C° –ra helyeztük.



1. ábra: A halak érkeztetése (Xiphophorus helleri).



2. ábra: A halak érkeztetése (Guppy vegyes).



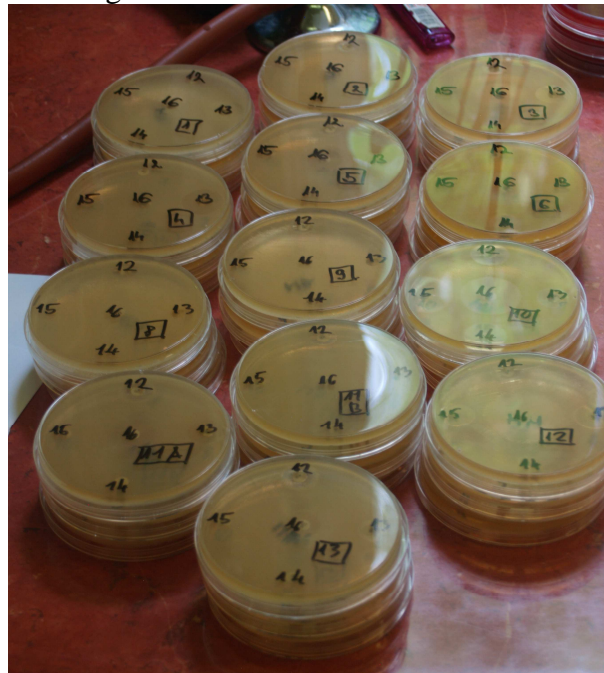
3. ábra: Vizsgálatra gyűjtött halak és az izoláláshoz előkészített táptalaj.



4. ábra Laboratóriumi felszerelések a rezisztencia vizsgálatokhoz.



5. ábra A Patológiai tanszéken felhasznált rezisztenciakorongok.



6. ábra. Elbírálásra váró baktérium rezisztencia vizsgálatok.

3.3. Fénymikroszkópos vizsgálat

Több fénymikroszkópos vizsgálatot is végeztünk, a szakdolgozat elkészítése során. Ezek közül az egyik nagy jelentőséggel bíró vizsgálat, a még a boncolás során a hal test felszínéről, a belső vizsgálatot megelőzően, a pikkelyezettség irányával megegyező irányba „bőr”- kaparéék minta vétele, amit natívan, fénymikroszkóp alatt vizsgáltunk első sorban ekto-paraziták jelenlétét kutatva.

A bakteriológiai intézetben szintenyésztetté kitenyésztett mintáinkból izolált baktériumok fénymikroszkópos vizsgálatát is elvégeztük. Ennek során a Gram-féle festési eljárással festettük meg a mintánkat. (8-9.ábra)

Gram-festés

A szintenyészteteinkből egy-egy külön álló telepet steril oltókaccsal levéve, azt a már előre zsírtalanított tárgylemezre helyeztük, majd egy csepp fiziológiás oldattal szuszpendáltuk. Ezt követően az oltókacsot a merőlegesen a tárgylemezre fektetve a szuszpenziót a tárgylemez 3/4 részére szélesztettük. A levegőn való szárítást követően a tárgylemezeket Bunsen égő lángjában áthúzva fixáljuk, csak ezt követően kezdetünk hozzá a festéshez.

A festés menete:

- (1) a kenetet Gentiana-ibolyával festjük 3 percig
- (2) a leöntést követően Lugol-oldattal festjük 1,5 percig
- (3) a következő lépés a differenciálás, az alkoholos öblítést mely kivonja a festéket a Gram (-) sejtek falából, vízzel is öblítjük a kenetet
- (4) híg vizes fukszinnal 1 percig festünk, majd ezt követően is vízzel öblítünk

- a kenet itató papíros és levegőn történő szárítása után, készen állnak a mikroszkópos vizsgálatra.

A festési eljárás a baktériumok eltérő sejtfal tulajdonságán alapul. Mivel a Gentiana-ibolya festék a mintában szereplő összes baktérium sejtfalát megfesti, ez önmagában nem lenne differenciáló, de az ezt követő Lugol-oldat hatására –jód pararozanilin- keltelkezik, ami viszont csak a Gram (+) baktériumokban kötődik irreverzibilisen a sejtfalhoz, ezért a

következő lépésben az alkoholos kezelés ezen sejtfalakat kivéve a festéket nagy részét eltávolítja. Így a Gram (-) baktériumok színüket veszítik, halványpirosas színben tűnnek fel ellentétben a Gram (+) baktériumok sötétkék színével.

A festett keneteket a mikroszkóp 100x-os nagyítású immerziós objektív lencséjét használva vizsgáljuk. Immerziós lencséről lévén szó a megfelelő törésmutatójú közeget biztosítandó, egy csepp cédrus olajat szükséges a tárgylemezre cseppenteni, és ebbe engedni az objektívet.

3.4. Preparátum jelölés

A minták, preparátumok, a primer-, később szín-baktérium tenyészetek, kenetek pontos jelölése a vizsgálatok folyamán alapvető fontosságú volt a precíz nyomon követhetőség és a minták, majd később a tenyészetek nagy száma miatt is.

A halak boncolásakor, minden egyed, egyedi vizsgálati sorszámot, nem, és származási hely jelölést, és olykor külön rövid ismertetőt is kapott, amit a munka naplóba pontosan datálva jegyeztünk fel. A primer vegyes baktérium tenyészetek Petri csészéjére így a későbbiekben már elégség volt a minta sorszámát, és az oltás dátumát feljegyezni. A Bakteriológiai Intézetbe további vizsgálatokra kiválasztott minták az ottani megérkezésüket követően új azonosító számozást kaptak, mivel egy-egy vegyes tenyészetből esetenként több baktérium is kioltásra került. Az intézetben viszont a különböző vizsgálatok már csak ezen jelölés szerint folytak. A Petri csészék jelölését a hátoldalukon alkoholos filccel, a kenetek jelölését üvegkarcolóval végeztük.

3.5. Bakteriális anyagcsere vizsgálatok

Haemolízis

Mivel szándékunkban állt az egyes baktérium törzsek meghatározása is, megfigyeltük, hogy véres agar táptalajra kioltott egyes baktérium törzsek anyagcseréjük közben jól látható haemolízist végeztek. Vizsgáltuk a mintáink haemolizáló tulajdonságait is ahol három fő csoportot tudtunk elkülöníteni, alfa- béta- haemolizálók, gamma-, vagy

nem haemolizáló. Az alfa-haemolízis következtében a baktérium telepek környezetében a táptalaj zöldes elszíneződést mutat, ez annak a következmény, e hogy a baktérium anyagcseréje során hidrogén-peroxidot állít elő, ami az agarban található haemoglobint, methaemoglobinná oxidálja. A béta-haemolízisnél a táptalaj teljesen elvesztette színét és sárgás-áttetszővé válik a baktérium telepek környezetében, ez annak tudható be, hogy az adott baktérium egy Streptolysin exotoxintermel ami a vörösvértestek teljes szétesését idézi elő. Többnyire *Staphylococcus*, *Clostridium* és *Listeria* fajok rendelkeznek efféle tulajdonsággal.

Oxidatív/Fermentatív (aerob/anaerob)

A szénhidrát metabolizmus oxidatív vagy fermentatív jellegének megállapítására az OF fél-folyékony táptalajt használjuk. Amely 0,3 % agart, peptont, glükózt (vagy más cukrot) és indikátorként brómtimolkéket tartalmaz. A vizsgálatot általában két csővel végezzük, az egyik csőbe lévő táptalajt a vizsgált mikroorganizmussal hegyes oltókacs segítségével beoltjuk (oxidatív cső). A másik csövet ugyanolyan módon beoltjuk, majd a táptalaj felszínére megolvasztott paraffint vagy viasz keverékét rétegezzük úgy, hogy az a táptalajt teljesen lezárja a légköri oxigéntől, ezáltal anaerob viszonyt teremtve (fermentatív cső). 24-48 óra inkubálás után bíráljuk el az eredményt. Amennyiben a baktérium anyagcserét folytat az adott kémcsőben a táplálékának szánt cukrot bontja, a savtermelés során a brómtimolkék indikátor színe zöldről sárgára változik. A lezárt csövekben egyértelműen megfigyelhető az esetleges gáztermelés is, gázbuborékok vagy a parafindugó alatt kialakuló gáz felhalmozódása révén. A teszt alkalmas *Staphylococcus aureus* és *Micrococcus* ssp. vizsgálatára. A próba elbírálását az alábbi táblázat tartalmazza:

Aerob tenyésztés	Anaerob tenyésztés	Elbírálás
+	-	Oxidatív (obligát aerob)
-	+	Fermentatív (obligát anaerob)
+	+	Oxidatív és Fermentatív (fakultatív anaerob)
-	-	Nem bontja a glükózt

1. táblázat Az oxidatív/fermentatív vizsgálat elbírálása.

Kataláz teszt

A kataláz teszt a baktériumtörzs hidrogén peroxid bontó enzimének jelenlétét vizsgálja. A kataláz enzim a hidrogén peroxidot vízzé és oxigénné bontja. A teszthez friss 24-48órás tenyészetet használunk. A baktérium színtenyészetünkéből egy telepet steril műanyag oltókaccsal levéve azt egy tiszta üveg tárgylemezre helyezve egy csepp 3%-os hidrogén peroxidot cseppentünk rá és figyeljük az esetleges apró gázbuborék képződést. Szintén a fent említett törzsek *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus ssp* és *Enterococcus faecialis* vizsgálatára alkalmas.

Oxidáz próba

Oxidáz-próba alatt az oxidatív anyagcserét folytató baktériumok terminális oxidációjában résztvevő citokróom-oxidáz enzim kimutatását értjük. A kimutatás során a friss baktérium színtenyészetéből steril műanyag oltókaccsal egy telepet egy szűrő papírra kenünk, majd 1 %-os színtelen tetrafenilén-diamin-oldatot cseppentünk a mintára. Amennyiben a mikroba termel oxidáz-enzimet a szűrőpapíron a baktériumoknál sötétkék elszíneződés lesz látható.

BIOLOG teszt

Mikroba közösségek szubsztrát hasznosításának vizsgálatára szolgáló teszt. Egyes izolált baktériumainkat család meghatározás céljából vetettük alá e tesztnek, ahol a BIOLOG mikrolemezek mind a 31 cellájába eltérő mikrobiális tápanyagot (szubsztrát) és tetrazólium-vörös indikátort helyeznek el a lemez gyártásakor. A baktériumokból előkészített és bemért oldatunkat a cellákba mérjük. Ezután a lemezeket termosztátba helyezük. A szaporodás során a cellákban lévő mikroorganizmusok vagy fel. tudják használni a cellába lévő tápanyagot, vagy nem. Ezt színváltozás jelzi. Így különböző anyagcsere mintázatok alakulnak ki, melyek lehetővé teszik a mikrobaközösségek gyors anyagcsere jellemzését. A tesztben mérhető színváltozást a tetrazólium-vörös indikátor redukciója szolgáltatja. Az indikátor elszíneződését a mikrobák légzése következtében

keletkezett NADH váltja ki. A cella + vagy - mivoltát vagy műszerrel, vagy szabad szemmel is elbírálnak. Az eredményeket egy erre kifejlesztett számítógépes szoftverbe bevive szinte azonnal megkapjuk a lehetséges eredményeket.

3.6. Rezisztencia vizsgálat

A baktériumok antibiotikum és más kemoterápiás szerekre adott reakciójának *in vitro* leggyakrabban végzett vizsgálat módszere a korongdiffúziós módszer, ezért vizsgálataink során mi is ezt alkalmaztuk.

A vizsgálandó törzs friss, általában egy napos színtenyészetéből, steril oltókaccsal a megfelelő baktérium mennyiséget levéve egy szintén steril 2ml fiziológiás oldatot tartalmazó kémcsőbe mossuk, majd egy vortex segítségével fél McFarlain-es homogén oldatot készítünk. Ebből a már előkészített Müller-Hinton agarokra egy steril tampon segítségével egyenletesen a Petri-csésze teljes felületén szélesztjük a szuszpenziót. Ezt követően a vizsgálni kívánt antibiotikumok számától függően 5-6 antibiotikummal átitatott papírkorongot helyezünk el a Petri csészében egymástól körülbelül egyenlő távolságban csipesz segítségével ügyelve arra, hogy a táptalajt a csipesszel ne érintsük, és a különböző mintákat tartalmazó csészék között a csipeszt mindig gázlángban sterilizáljuk.

Az elkészített mintákat ezután inkubátorban 28C° –on 24 órán keresztül hagyjuk növekedni egy minta kivételével ahol a korrekt elbíráláshoz 48 órás tenyésztés volt szükséges.

Az inkubációs idő alatt, az itatós korongokban lévő baktérium ellenes szer tulajdonságaitól függően a táptalajba diffundál és a baktérium szerre való érzékenységének függvényében akadályozza, illetve gátolja annak szaporodását. Ez a tenyésztési idő végén szabad szemmel látható gátlási gyűrűket eredményez. A gyűrűk léte, illetve nagysága szerint eldönthető hogy a vizsgált baktérium törzs mely antibiotikumra érzékeny, mérsékelten érzékeny, vagy rezisztens. A gátlási gyűrűk milliméterben mért átmérőjéből számszerűen is kifejezhető a rezisztencia illetve érzékenység mértéke. A mérést legegyszerűbben egy vonalzó, milliméter beosztásának segítségével lehet elvégezni. Ezen adatok tudatában már egyértelműen kiolvasható mely szer/szerek a leghatékonyabbak az adott baktérium törzs elleni kezelésben.

Az antibiotikumok és más kemoterápiás szerek iránti érzékenység *in vitro* vizsgálatára számos módszer ismeretes. Ezek közül gyakorlati célokra a korongdiffúziós módszer a legalkalmasabb, vizsgálataink során mi is ezt alkalmaztuk. A vizsgálandó baktériumtörzs friss tenyészetéből egy leégetett oltókaccsal mintát vettünk, amit néhány ml desztillált vízben szuszpendáltunk. Majd egy steril tamponnal a mintát Müller-Hinton táptalajon szélesztettük. Ezután egymástól közel egyenlő távolságra papírkorongokat helyeztünk.

A szélesztést és a korongok szakszerű elhelyezését követően a táptalajokat 24 vagy 48 óráig inkubáltuk. A korongokban lévő szer a táptalajba diffundál. A szerre jellemző diffúzió mértékétől és a baktériumfaj érzékenységétől függően kisebb-nagyobb mértékben akadályozza a baktériumok szaporodását. A korongok körül kialakult gátlási gyűrű átmérője alapján eldönthető, hogy a vizsgált baktériumtörzs melyik gyógyszerre érzékeny, mérsékelten érzékeny vagy rezisztens, s kiválasztható az adott betegség gyógykezelésére szóba jöhető leghatékonyabb szer.

A vizsgált baktérium rezisztens az adott antibiotikumra, ha az antibiotikum korong körüli gátlási gyűrű egyenlő vagy kisebb a megadott alsó értéknél. A baktérium érzékeny rá, ha a gátlási gyűrű egyenlő vagy nagyobb a megadott felső értéknél. Az alsó és a felső érték közötti eredmények a mérsékelten érzékeny kategóriába tartoznak.

4. Eredmények

4.1. Izolált baktériumok

Munkám során közel 60 esetben izoláltam baktériumokat véres agaron majd oltottam tovább Müller-Hinton agarra rezisztencia vizsgálat céljából. A TRIO-Ker kft. -től beszerzett mintákat az Állatorvosi Egyetem különböző tanszékein dolgoztuk fel. Készítettünk belőlük szintenyészetet végeztünk különböző rezisztencia vizsgálatokat.

4.1.1. A Baktériumok anyagcsere vizsgálata

A fentebb részletesen leírt anyagcsere vizsgálatokat a kiválasztott baktériumainkon elvégezve az alábbi eredményeket kaptuk.

Minta/teszt	Kataláz	Oxidáz	OF	Haemolízis	Kenet (Gram szerint)	Fénymikroszkópban
BF1	-	+	Fg	béta	-	pálca bipol.test közepes
BF2	-	+	Fg	béta	-	pálca bipol.test közepes
BF3	-	+	Fg	béta	-	pálca
BF4	+	+	Fg	béta	-	pálca közepes
BF5	-	+	Fg	béta	-	pálca vastagabb
BF6	+	+	O	-	-	pálca hosszú karcsú
BF7	-	+	-	-	-	pálca bipoláris
BF8	+	+	O	-	-	pálca bipoláris
BF9	+	+	O	béta	-	pálca vékony karcsú
BF10	0	-	O/-	-	+	pálca vastag kerekített végű
BF11A	-	+	Fg	béta	-	pálca duzzadt bipoláros
BF11B	+	+	O	-	-	pálca bipoláros
BF12	-	+	Fg	béta	-	pálca vaskos bipoláros
BF13	-	+	Fg	béta	-	pálca vaskos bipoláros

2. táblázat A részletesen vizsgált mintáink anyagcsere eredményei.

Az eredményekből kitűnik, hogy baktériumaink többsége béta-haemolízist folytatott, oxidáz pozitív volt, és gáztermelés kíséretében fermentatív tulajdonsággal is rendelkezett. A táblázatban szürkével jelölt minták kerültek a későbbi törzs meghatározási vizsgálatra. Ezek kiválasztásánál igyekeztünk a változatos anyagcsere profilú baktériumokat kiválasztani.

4.2. Betegségek

4.2.1. Guppi myxobacteriózisa, flavobacteriózisa: Guppi-betegség

Egyes vizsgált guppikban a Guppi betegségként ismert tünet együttes volt megfigyelhető. Főleg a guppi hímeknél a farok és úszók rothadása, míg a nőstényeknél többnyire a testfelületen szövethiányos területek melyek a alapját sárgás színű, elhalt szövetmaradványok alkották. A testfelületről és a kezdődő elváltozások széli részéről a jellegzetes myxobaktériumok és flavobaktériumok natív felhőit lehetett látni mikroszkópos vizsgálattal, melyeket kioltva azok véres agaron jól fejlődtek és velük a későbbi rezisztencia vizsgálatok is könnyen végezhetőek voltak. Egysejtű csillósok közül a *Tetrahymena pyriformis* és a *Coleps hirtus* csillósok nagyfokú elszaporodása esetén okozhatnak elváltozásokat, fordulhattak elő a halakon.

4.2.2. Halak szeptikémiájáról általában

A megvizsgált és a felboncolt beteg halaknál a következő tünetek és elváltozások voltak láthatóak: a halak lomhán a vízfelszín közelében úszkáltak, bágyadtnak és egészséges társaikhoz képest fakóbb színűnek tűntek. A halakra az étvágytalanság és idült esetben a lesóványodás volt jellemző. Heveny esetekben vérzések és eróziók voltak fellelhetők a bőrön és az izmokban, úszó és farok elhalás (úszó rothadás, farok rothadás) fordult elő, exophthalmus, has úri folyadékgyülem és helyenként a pikkelyek leválása is megfigyelhető volt, továbbá a kopolyúban is vérzések mutatkoztak. A belső szervekben apró vérzések voltak, a hasüregben vörhenyes folyadék halmozódott fel. A lép és a vesék megnagyobbodottak voltak. Túl heveny esetek is előfordultak, amikor az elhullott halakon nem mutatkoztak elváltozások. A betegség idült formájában szenvedő halakon tályogok és fekélyek voltak megfigyelhetők, ezek a fekélyek, mint bemeneti kapuk, esetenként felülfertőződtek halpenésszel (*Saprolegnia*). Kannibalizmus jelei is megfigyelhetőek voltak a farkon és az úszókon. (Roberts, 2001)

4.2.3 Gyrodactylosis - hámférgesség

Egy körülbelül fél milliméter hosszúságot elérő, bőrélősködő laposféreg. Mely elsősorban az édesvízi halak hámjában és nyálkában él, élősködik. Masszívabb fertőzés esetén bemeneti kaput hoz létre a másodlagos fertőzéseknek. Sós vízben nem él túl ezért behurcolásának megelőzése viszonylag egyszerű. (Horn Péter és mtsai 1976, Bailey és mtsai, 1999) Schlotfeldt, Alderman, 1995)

4.2.4 Trichodina csillósok

Ez az egysejtű ectoparazita csak mikroszkóppal látható 30–90 µm méretéből kifolyólag. Csillóival mozgásra képes, a hal bőrfelszínén, pikkelyein és nyálkájában él. Masszív fertőzöttség esetén legyengíti a gazda állatot, és bemeneti kaput teremt a másodlagos bakteriális betegségeknek. A pikkelytakaró fakó színe, szürkés elszíneződése, szapora légvétél hívhatja fel a figyelmet a fertőzöttségre. A szapora légvétél a hal védekező reakciója miatt alakul ki, mi szerint igyekszik megvastagítani teste nyálka takaróját, de ezzel jelentősen rontja a test gázcseréjét.

4.3. Rezisztogram

4.3.1. Mintáink rezisztogramja (Patológiai tanszéken)

Patológiai tanszéken végzett egyszerű rezisztencia vizsgálatokat a gyakorlatban használatos és jól bevált módszerrel végeztük. A primer vegyes tenyészetünkéből kiszélesztettük a baktériumait Müller-Hinton agarra majd erre az általunk vizsgált antibiotikumok korongjait helyeztük fel. Egy-egy mintából több különböző baktériumot is használtunk.

Anitb./ Minták	3 Xipho /1	3 Xipho /2	6 Guppi/1	6 Guppi/2	6 Guppi/3	6 Guppi/4
Clindamicin (DA)	0	0	0	0	0	0
Enrofloxacin (ENR)	9	8	12	11	8	7
Florfenicol (FFC)	2	2	14	14	13	12
Oxytetracilin (T)	0	0	0	0	0	0
Pradofloxacin (S)	10	8	11	11	8	8

3. táblázat Az adott baktérium izolátumok rezisztencia tulajdonságai (a számok a gátlási zóna milliméterben megadott átmérője.)

Ebből a vizsgálatból látható, hogy a Clidamicin és Oxytetracilinre adott bakteriális válasz teljes rezisztenciát mutatott, baktériumtól függetlenül. Gátló hatás volt megfigyelhető Enrofloxacin és Pradofloxacin korongok környezetében, míg a leghatásosabb szernek e vizsgálatban a Florfenicol mutatkozott.

4.3.2. Mintáink rezisztogramja (Mikrobiológiai tanszéken végzett laboratóriumi körülmények között)

Mintáinkból fél McFerlin-es oldatot készítve, azt Müller-Hinton agaron megszélesztve, a standardizálás végett 24 órán keresztül 30C° –on inkubáltuk, kivéve a BF7-es mintánkat, amely elbírálásoz 48órás tenyésztésre volt szükség.

	BF1	BF2	BF3	BF4	BF5	BF6	BF7*	
Amoxicillin	0	0	0	0	0	0	0	23
Ampicillin	0	0	0	0	0	0	0	14
Cephalexin	0	0	18	0	20	0	0	0
Ciprofloxacin	8	8	28	16	16	18	18	24
Clindamycin	0	0	0	0	10	11	11	32
Doxycyclin	0	0	21	9	19	21	21	30
Enrofloxacin	0	0	25	20	18	24	24	29
Erythromycin	0	0	17	0	12	0	0	8
Florfenicol	28	24	34	11	21	12	12	27
Kanamycin	13	9	13	0	11	0	0	0
Metronidazol	0	0	0	0	0	0	0	0
Neomycin	7	10	9	0	0	0	0	0
Nitrofurantion	20	19	20	22	0	0	0	18
OTC	0	0	8	0	22	14	14	24
Penicillin	0	0	0	0	0	0	0	10
SXT	18	15	17	0	0	0	0	14

4. táblázat Az adott baktérium izolátumok rezisztencia tulajdonságai (a számok a gátlási zóna milliméterben megadott átmérője (1-7 minta))

	BF8	BF9	BF10	BF11A	BF11B	BF12	BF13	
Amoxicillin	0	0	27	0	0	0	0	0
Ampicillin	0	0	21	0	0	0	0	0
Cephalexin	0	0	17	15	0	16	16	17
Ciprofloxacin	24	26	16	20	16	22	22	23
Clindamycin	0	0	17	0	0	0	0	0
Doxycyclin	0	0	29	14	0	18	18	13
Enrofloxacin	11	21	18	22	14	21	21	24
Erythromycin	0	0	18	13	0	15	15	10
Florfenicol	0	0	22	35	0	33	33	33
Kanamycin	18	18	18	13	17	15	15	11
Metronidazol	0	0	0	0	0	0	0	0
Neomycin	12	12	15	10	12	10	10	12
Nitrofurantion	0	0	15	16	0	17	17	13
OTC	0	0	20	0	0	0	0	0
Penicillin	0	0	21	0	0	14	14	0
SXT	0	0	15	14	0	20	20	15

5. táblázat Az adott baktérium izolátumok rezisztencia tulajdonságai (a számok a gátlási zóna milliméterben megadott átmérője (8-13 minta))

A szintenyészetünket végzett 16 antibiotikumra kiterjedő vizsgálat eredményéből látható, hogy rezisztenciát legtöbbször a régóta forgalomban lévő antibiotikumokra kaptunk. (penicillin csoport). Továbbá a Metromidazolra is teljes rezisztencia volt kimutatható. Egyedüli szerként csak a Ciprofloxacín, volt az, melyre minden baktérium érzékenységet mutatott. Ezen kívül relatív nagy gyakorisággal a Kanamycin, Neomycin, és a Florfenicol váltott ki negatív reakciót a baktérium kultúráinkban. A többi antibiotikus szer változó hatásfokkal fejtette ki hatását a baktériumok szaporodására.

A minták felől vizsgálva is eltérő eredményeket kaptunk hisz voltak rendkívül ellenálló törzsek (BF8,BF11B) és majd csaknem minden antibiotikumra érzékenységet mutató törzs is (BF10).

A vizsgált 14 baktérium mintánk közül a legtöbb a Metromidazolrae volt rezisztens, bár az Amoxicillin és Amplicillre is nagyfokú rezisztencia volt tapasztalható. szám szerint 14 rezisztens és 4 mérsékelten érzékeny törzs fordult elő. Bár a neomycinre csak 1 volt rezisztens, de 8 törzs mérsékelt érzékenységet mutatott. A sztreptomicinnél 4 rezisztens és 3 mérsékelten érzékeny izolátum akadt. Az oxilinsav, szulfametoxazol-trimetoprim és a klóramfenikol esetében a rezisztens törzsek száma egyaránt 4 volt. A leghatékonyabban még a flumequin alkalmazható, de itt is volt 2 rezisztens és 2 mérsékelten érzékeny törzs. Díszhalaknál előfordultak polirezisztens baktériumok is. Az adatokból leszűrhető, hogy a gazdasági halakból izolált baktériumoknál még nem alakult ki annyi rezisztens törzs, mint a díszhalak esetében, ahol gyakrabban használnak antibiotikumokat és kemoterápiás szereket.

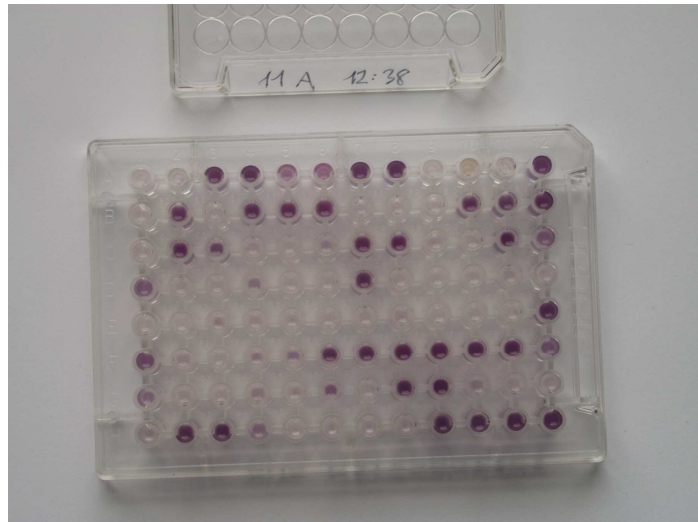
4.3.3. Mintáinkból meghatározott baktériumok faji szintű felsorolása

Kiválasztott mintáinkból az mikrobák anyagcsere sajátosságait vizsgálva BIOLOG teszttel a következő baktérium törzseket sikerült meghatároznunk. Az eredmények leolvasásakor figyelemmel kell lenni arra, hogy ezen eredmények az anyagcsere profil alapján legvalószínűbb törzseket jelenítik, meg így nem adhatnak 100%-os eredményt. A BF10 mintánknál például nem lehet nagybiztonsággal kijelenteni egyetlen törzset, ennek eldöntésére további vizsgálatok lennének szükségesek.

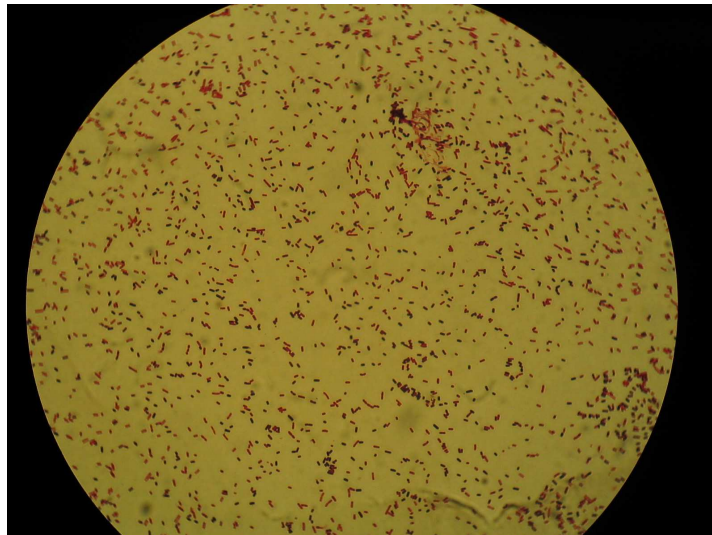
Baktériumok neve	Halfaj	előfordulás gyakorisága	általunk adott kód
<i>Aeromonas veronii</i>	Xipho	9 eset/17 hal	BF2
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Guppi	11 eset/31 hal	BF4
<i>Chyseeobacterium glenum/indiogenes</i>	Guppi	7 este/31 hal	BF6
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	Guppi	13 eset/31 hal	BF9
* <i>Kurtia gibsonii</i> // <i>Brevibacterium casei</i>	Diszkosz	1 eset/3 hal	BF10
<i>Aeromonas encheilia</i>	Sziámi harcos	2 eset/5 hal	BF11A
<i>Pseudomonas putida</i>	Sziámi harcos	1 eset/5 hal	BF11B

6. táblázat A kiválasztott mintáinkból meghatározásra került baktérium törzsek.

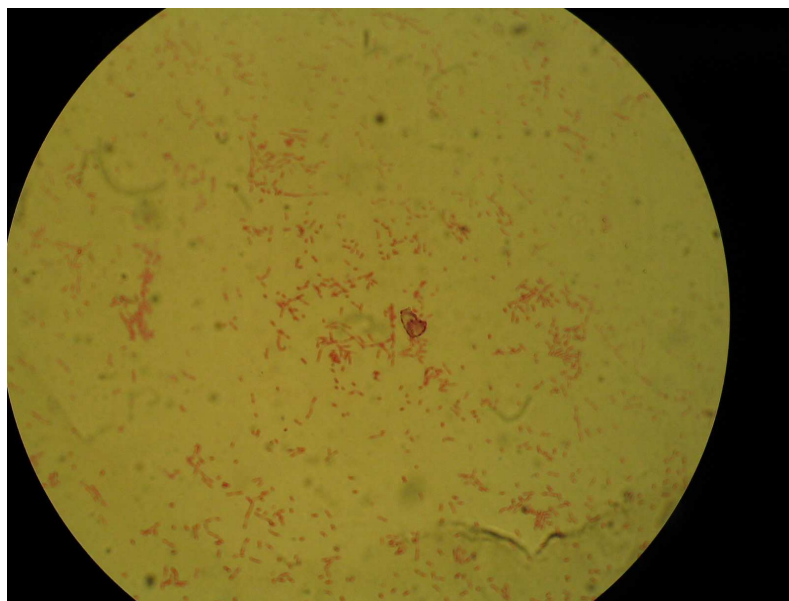
Az általunk meghatározott 7 baktérium törzs közül legérzékenyebb kétségtelenül a feltehetően *Kurtia gibsonii* –nak meghatározott törzs volt. A többi törzs eltérő rezisztenciát mutatott a különböző szerek iránt, Sajnos a többi törzsnél is erős multirezisztencia volt látható. Ezen adatokból egyértelműen leszűrhető, hogy a gyűjtött díszhalak esetében igen gyakran használnak antibiotikumokat és kemoterápiás szereket, és azokat szükségtelenül vagy nem megfelelő módon teszik.



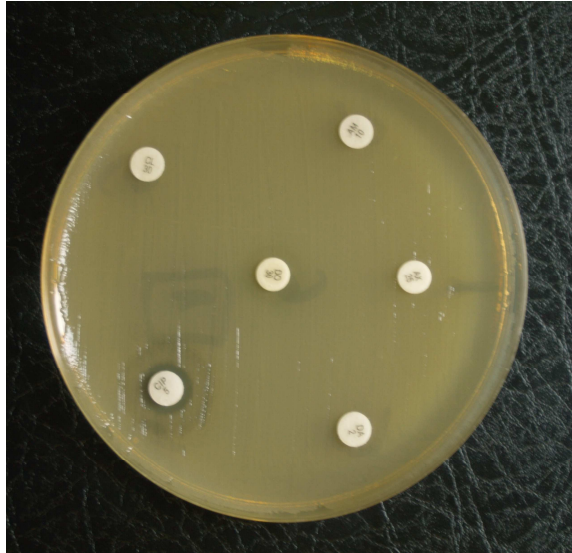
7. ábra A BF11A mintánk BIOLOG profilja



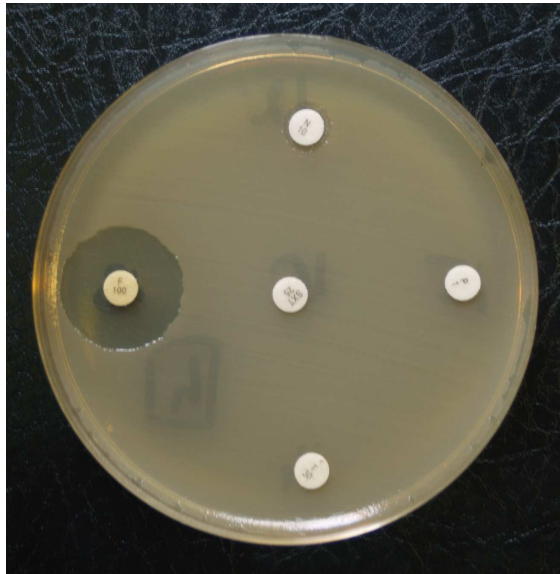
8. ábra A BF10-es minta Gram pozitív baktériumainak mikroszkópos képe



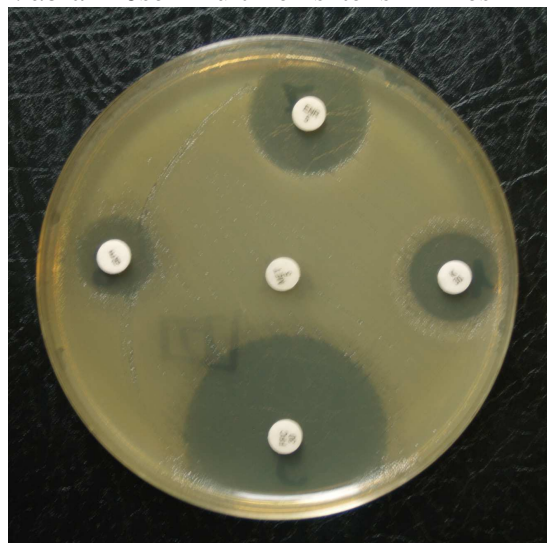
9. ábra Gram negatív baktériumok mikroszkópos képe



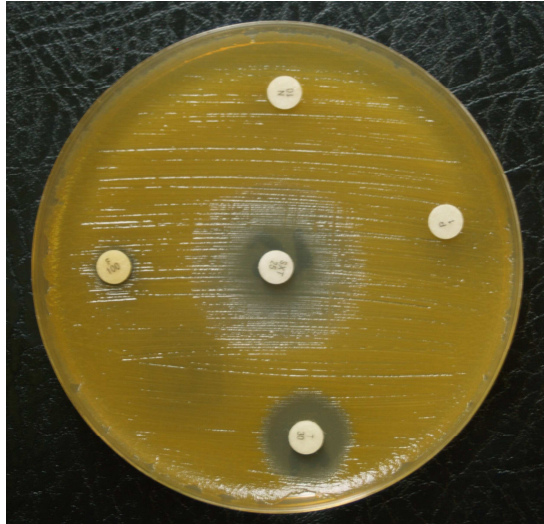
10. ábra Erősen multi rezisztens BF1-es minta



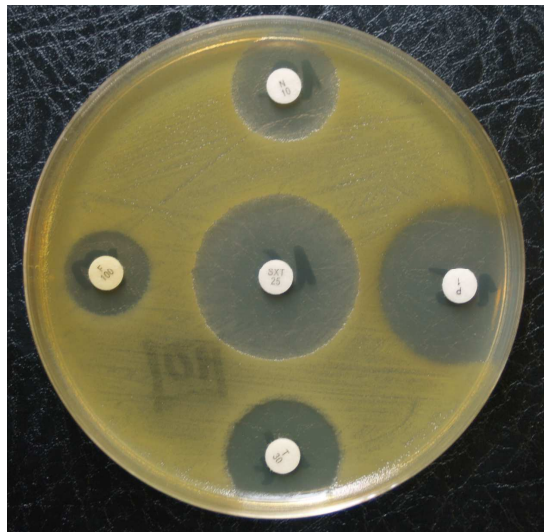
11. ábra Erősen multi rezisztens BF4-es minta



12. ábra A BF12-es minta érzékenysége mérsékelt



13. ábra BF6-os minta



14. ábra Egy antibiotikumokra érzékeny mintánk (BF10)



15. ábra BF12es minta vegyes rezisztenciát mutató képe kettős gátlási gyűrűvel

5. Megbeszélés

A munka befejeztével a következő következtetések vonhatóak le a szakdolgozat témájában.

A távol keleti import halszállítmányok által behurcolt bakteriális betegségek esetében, a korábban már sejtett, nagyfokú bakteriális multi rezisztencia jelen van, és fent áll. Ezt vizsgálatainkkal sikerült is kétséget kizáróan bizonyítanunk. Továbbá a kórokozó baktériumok törzseinek azonosításával sikerült megállapítanunk, hogy ezek a baktériumok legtöbbször a hal környezetében élő fakultatív patogén törzsek, melyek egészséges állományban nem jutnak megbetegítő szerephez. A betegség felszínre jöveteléhez így mindenképpen hajlamosító körülményekre van szükség. Ez többek között lehet az ázsiai tenyész telepeken uralkodó állapotok, parazitás fertőzések, szükségtelen vegyszeres kezelések, zsúfolt tartás, és nem utolsósorban a rendkívül megterhelő és hosszas utaztatás. Az így legyengült halak már könnyen szolgálnak kiinduló pontként a további bakteriális megbetegedésekhez.

Tapasztalataink szerint a boncolás során készített 'primer' vegyes baktérium tenyészeteken korongokkal elvégzett korongdiffúziós *in vitro* rezisztenciavizsgálat módszere megbízhatóan tájékoztat az adott mintában lévő kultúra antibiotikum rezisztenciájáról, antibiotikum érzékenységről, lehetővé téve az esetleges gyors beavatkozást. A terepen vételezett és kikent minták eredménye is megbízhatónak minősült, mivel az esetlegesen szennyező, (humán) baktériumflóra, nem növekedik 35 – 37 °C-nál alacsonyabb hőmérsékleten. Így a szoba hőmérsékleten végzett inkubáció során csak a vízi élettérre jellemző, számunkra fontos baktériumok fognak táptalajunkon kinőni. Az esetleges külső szaprofita baktériumok mintába való kerülését kivédhetjük, ha a halak testfelületét alaposan leégetjük a mintavétel, és a testüregek megnyitása előtt.

6. Összefoglalás

Munkák során a Távolsági Keleti halszállítványokból (Sri Lanka, Thaiföld) gyűjtött mintáinkból végeztünk általános kóronctani vizsgálatokat, baktériumizolálást, készítettünk szintéziszeteket és az izolált baktériumok faj és törzsmeghatározását.

Azért választottuk ezen, messzi régiót vizsgálataink célterületéül, mert mind a hazai, mind az Európai akvarisztika, és tavi díszhal tartás mára már nagyrészt, ha nem kizárólagos jelleggel, e területről, import révén van ellátva halakkal. Témánk a halakkal behurcolt betegségek rezisztenciájára fókuszált, és igyekezett megerősíteni vagy éppen cáfolni azon alapos feltételezést miszerint, a külföldről importált halakkal rendkívül ellenálló betegségeket is importálunk Európába, és a világ más részeibe. Továbbá az így behurcolt betegség igen nagy pusztítást képesek előidézni az otthoni haltartó már meglévő állományában, így a legnagyobb kár itt keletkezik.

Több szintű vizsgálataink során egyértelműen beigazolódott a már régóta fent álló gyanú, miszerint az importált halakkal behurcolt betegségek, és ezeket okozó baktérium törzsek igen magas fokú multi rezisztenciával rendelkeznek a legtöbb általunk kiválasztott és vizsgált antibiotikumra. Ennek oka valószínűleg többrétű. A tenyészetekben, és a szállítás során indokolatlanul, szinte adalékanyagként használt, szakszerűtlenül, nem megfelelő dózisban esetleg ideig alkalmazott kemoterápiás, antibiotikus szerek használata. De ennek pontos feltárása további kutatásokat igényelne.

Eredményeinkkel segítséget szeretnénk nyújtani a magyar és Európai akvaristáknak és más haltartóknak, felhívva figyelmüket eme égető problémára, mivel végre egyértelműen sikerült bizonyítanunk, és tényként reprezentálnunk e tényt. Reméljük e kutatással és annak eredményeivel sikerült felhívjuk figyelmüket a megelőzés fontosságára. Továbbá ha már megtörtént az állomány fertőzése, kutatásaink a szakszerű és eredményes kezelésben is segítséget nyújthatnak.

7. Summary

While we were working, we collected samples from fish which was shipped from far East (Sri Lanka, Thailand) and we made general pathological examinations, bacterial isolation, colour cultures and we also determined the species and tribes of these isolated bacteria.

The reason why we choosed this region as our target area of our examinatioins beacuse as the interior and as the european aquarium and the keeping of the ornamental lacustrine fish is supplied in most of the cases by these regions. Our subject focused on resistance of the diseases which is brought in with imported fish. We try to confirm or confute with hard work these thorough supposition, which is about the imports of the extremely resistant diseases with shipped fish to Europe and through and around the whole world. Furthermore, this imported disease can make seriously damage to the holders whose fish can be infected by these fish so they suffer the best.

During our multilevel analysises, the fact is proved without doubts that these disease and the bacterial trigels which is bringed in with imported fish and cause the symptomes, have high level of multiresistence to those antibiotics which were choosed and tested by us. The reason is probably complex. They use materials causeless, unprofessional, as additive, inappropriate dose, and also for a while as chemotherapeutic and antibiotal substance in the cultures during the shipping. However, more research need to explore the exact reasons.

We are willing to help to european and hungarian akvarists and to other person who keeps fish with our results to draw attention to this problem which is very serious and we finally could represent the facts and details. We hope that we could draw the attention to the importance of the prevention with this research and these results. Moreover, if the infection is happened, our research can help with the workmanlike and successful treatmen.

8. Szakirodalom

- Ansary, A., Haneef, R. M., Torres, J. L. és Yadav, M. (1992) Plasmids and antibiotic resistance in *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Biology*, 15, 191-6.
- Aoki, T., Egusa, S. (1971) Drug sensitivity of *Aeromonas liquefaciens* isolated from freshwater fishes. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 37, 176-85.
- Aoki, T. , Mitomoa, Y., Crosa, J. H. (1986) The characterization of a conjugative R-plasmid isolated from *Aeromonas salmonicida*. *Plasmid*, 16, 213-218.
- Bassleer, G. (1997) *Colorguide of tropical fish diseases*. Bassleer biofish, Belgium, 271 pp.
- Bíró G. (1993) *Élelmiszer-higiéncia*. Mezőgazdasági Kiadó 262-266.
- Chang, B. J. és Bolton, S. M. (1987) Plasmids and resistance to antimicrobial agents in *A. sobria* and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31, 1281-2.
- G. Vivekanandhan, K. Savithamani, A.A.M. Hatha, P. Lakshmanaperumalsamy (2002) Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India . *International Journal of Food Microbiology* 76 165-168
- Hedges, R. W. , Smith, P. , Brazil, G. (1985) Resistance plasmids of *Aeromonads*. *Journal of General Microbiology*, 131, 2091-5
- Horn Péter, Zsilinsky Sándor (1976) *Akvarisztika* 297-310.
- Inglis V, Cafini M, Yoshida T. (1995) The interaction of trimethoprim and quinolones against gram-negative fish pathogens. *J Appl Bacteriol.* 79(2):135-40
- Inglis, V., Roberts, R.J., Bromage, N.R. (1993) *Bacterial diseases of fish*. Oxford: Blackwell Scientific., 405 pp.
- Mary Bailey, Gina Sandford (1999) *Caring for your Aquarium* 113-116.
- Meyer, F. P. (1964) Field treatments of *Aeromonas liquefaciens* infection in golden shiner. *Progressive Fish-Culturist*, 26, 33-35.
- Mitchell, A. J. és Plumb, J. E. (1980) Toxicity and efficacy of Furanace on channel catfish infected experimentally with *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Disease*, 3, 93-100.

- Richards, R. H. , Inglis, V. , Frerichs, G. N. , Miller, S. D. (1992) Variation in antibiotic resistance patterns of *Aeromonas salmonicida* isolated from Atlantic salmon *Salmo salar* L. in Scotland. In Proceedings of OIE Symposium: Problems of Chemotherapy in Aquaculture: From theory to reality, Paris 12-15 March 1991 (Ed. By D. J. Alderman, C. Mitchel) pp. 278-39. Office International des Epizooties, Paris.
- Roberts, R.J. (2001) Fish Pathology. W.B. Saunders, 472 pp.
- Samuelsen, O.B., Torsvik, V., Ervik, A. (1992) Long-range changes in oxitetracikline concentration and bacterial resistance toward oxitetracikline in a fish farm sediment after medication. *Sci Total Environ.* 114:25-36
- Schlotfeldt, H.J., Alderman, D.J. (1995) What should I do? Handbook of the EAFP., 60 pp.
- Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Larsen, J.L., Dalsgaard I. (2001) Characterization of class 1 integrons associated with R-plasmids in clinical *Aeromonas salmonicida* isolates from various geographical areas. *J Antimicrob Chemother* 47(6):735-43
- Seaman, W. R. (1951) Notes on a bacterial disease of rainbow trout in a Colorado hatchery. *Progressive Fish-Culturist*, 13, 139-41.
- Semjén G. (1998) Állatorvosi gyógyszertan II, 345-411.

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani elsősorban a szakdolgozat elkészítésében nyújtott segítségért téma vezetőmnek Dr. Baska Fernec-nek, hogy szakmai iránymutatásával és a dolgozat lektorálásával segítette annak elkészültét a kezdetektől a végleges formáig bezárólag.

Továbbá a TRIO-Ker kft.-nek az általa felajánlott halmintákért, az ott dolgozóknak a mintagyűjtésben nyújtott segítségükért.

Dr. Makrai László-nak a Bakteriológiai Intézetben végzett munka szakszerű felügyeletéért és építő jellegű kritikájáért, mellyel igyekezett a dolgozatban elvégzett bakteriológiai vizsgálatok megismételhetőségét és standardizálását biztosítani, valamint Prof. Dr. Rusvai Miklósnak, hogy biztosította a tanszék forrásait az általunk végzett vizsgálatok elvégzéséhez.

Budapest, 2014-11-20.

Klébert Gergely

Szerzői jogi nyilatkozat: HuVetA-SZIA