

Evaluation of the most important anaerobic bacteria in the pathogenesis of canine periodontitis

H. Kalla^{1*}
Z. Lajos²
M. P. Dunay³

1. Nemzeti Élelmiszerlánc-
biztonsági Hivatal,
Állat-egészségügyi Diagnosztikai
Igazgatóság, Emlős-, Vad- és Baromfi-
betegségek Laboratóriuma
H-1143 Budapest, Tábornok u. 2.

*e-mail: kalla.hedi92@gmail.com

2. Duo-Bakt Állatorvosi
Mikrobiológiai Laboratórium
Budapest

3. Állatorvostudományi Egyetem,
Sebészeti és Szemészeti
Tanszék és Klinika

A kutyák fogágygyulladásának kórfejlődésében szerepet játszó legfontosabb anaerob baktériumok vizsgálata

Kalla Hédi^{1*}, Lajos Zoltán², Dunay Miklós Pál³

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők célja a kutyák közepesen súlyos és súlyos fogágygyulladásainak háttérben álló legfontosabb anaerob baktériumok vizsgálata, a *Porphyromonas*- és *Prevotella*-fajok előfordulási arányának felmérése és ezen kórokozók antibiotikum-érzékenységének meghatározása, különös tekintettel a fogágygyulladás kezelésében rutinszerűen még nem alkalmazott pradofloxacinra. A kutyák szájhigiéniai állapotát leginkább az alkalmazott táplálék minősége és a plakk eltávolítását célzó otthoni kezelések befolyásolják. Az elhanyagolt esetekben hónapok-évek alatt masszív anaerob baktériumflórával terhelt, irreverzibilis fogágygyulladás fejlődik ki, amely már altatásban végzett állatorvosi beavatkozást igényel, megfelelő antibiotikum-kezeléssel kiegészítve.

SUMMARY

Background: The oral hygiene in dogs depends mostly on the quality of consumed food and plaque removal performed by the owner. In neglected cases severe, irreversible periodontitis with pockets containing anaerobic bacterial flora could evolve in months or years.

Objectives: The aim of this study was to isolate *Porphyromonas* spp. and *Prevotella* spp. from subgingival samples taken from dogs with moderate to severe clinical periodontal diseases, and the susceptibility testing of these strains, with special regard to pradofloxacin.

Materials and Methods: Samples for the study were collected while the dogs were under general anaesthesia. We collected 150 periodontal samples from 59 dogs. The samples were shipped directly to Duo-Bakt Laboratórium, Budapest, Hungary. At Duo-Bakt Laboratórium the samples were inoculated on a Wilkins-Chalgren (incl. 8% sheep blood) plate and on another plate, which included nalidixic acid and colistin. All plates were incubated in an anaerobic environment at 35 °C for 5–7 days, after which all pigmented colonies and the suspected non-pigmented *Prevotella* spp. colonies were selected. The identification was performed by analysing the morphology of the colonies, pigmentation, and the results of the presumptive tests. Final identification was performed by MALDI-TOF-mass spectroscopy.

Results and Discussion: During the study, 74 *Porphyromonas* and 2 *Prevotella* isolates were isolated, identified and transported to Laboklin, Bad Kissingen, Germany for antibacterial susceptibility testing. According to our results, pradofloxacin could be a promising choice in the treatment of periodontitis as in most cases the MIC values were under 0.1 mg/l. Based on our clinical experiences and the MIC values, amoxicillin-clavulanic-acid is still an appropriate antibiotic for the treatment of periodontal diseases in dogs, however, resistant strains to clindamycin and metronidazole were found. These antibacterial susceptibility test results could help veterinarians to create the best protocols for the treatment of periodontitis.

A fogágygyulladás a kutyák egyik leggyakoribb szájüregi megbetegedése, a két évnél idősebb egyedek mintegy 80–85%-át érinti. Epidemiológiai kutatások szerint az előfordulás aránya a korral növekszik, továbbá gyakrabban figyelhető meg kistestű, valamint miniatűr fajtákban (1, 2, 5, 9).

A fogágygyulladás a kutyák egyik leggyakoribb szájüregi megbetegedése

Idült, összetett kóroktanú betegség

A parodontitis egy idült, összetett kóroktanú (multifaktoriális) betegség. Mikrobiológiai, környezeti, viselkedési, szisztémás és genetikai tényezők is befolyásolják a betegségre való hajlamot, valamint a klinikai tünetek megjelenését. A fogágygyulladás alapját a fogkorona felületén képződő és ott maradó lepedék, ill. a benne elszaporodó, erősen a fogzománchoz kapcsolódó, biofilmet képző parodontogén baktériumok képezik. A parodontitis kialakulásának elsődleges oka a plakk, amelynek a felhalmozódásához számos tényező hozzájárul. Ide tartozik pl. a fogak torlódása, amely főként a brachycephal – angol bulldog, francia bulldog, boxer, shih-tzu stb. – kutyákra jellemző, a perzisztáló tejfogak, a malocclusio, nedves tápok etetése, a rossz szájhygiéna, ill. az immunrendszer csökkent ellenálló képességét előidéző állapotok, anyagcsere-betegségek, táplálkozási zavarok. A plakkban kezdetben az egészséges szájflórában dominánsan jelen levő aerob baktériumok – pl. az α -hemolizáló streptococcusok, a *Staphylococcus pseudintermedius*, *Escherichia coli* – szaporodnak el. A rendelkezésre álló oxigén felhasználásával az aerob környezet anaerob irányba tolódik el. Ez a folyamat az egészséges szájüregben kisebb számban jelen levő Gram-negatív anaerob baktériumok szaporodásához vezet (1, 5, 23).

A gyulladós folyamatokat a lepedékben elszaporodó Gram-negatív baktériumok indítják be

Az anaerob túlsúly kialakulása, azaz a biofilm „érése” indítja el – kezdetben csak helyileg – a gyulladós válaszreakciót. A gyulladás először az ínyszélen jelentkezik, ez általában már a plakk-képződést követő napokban megfigyelhető. A kialakult marginalis gingivitis még reverzibilis, azonban kezelés nélkül a folyamat idültté válik. A baktériumok jelenléte és anyagcsere-termékeik, mint kemotaktikus anyagok odavonzzák a vérben keringő neutrophil granulocytákat, amelyek phagocytálják a kórokozókat. A széteső neutrophilokból és a baktériumokból toxinok és szövetroncsoló enzimek szabadulnak ki. Ennek hatására a gazda szervezetében a kinin- és komplementrendszer, valamint az arachidonsav-kaszád is aktiválódik, beindítva ezzel a gyulladós válaszreakciót. A fibroblastok, ill. az odaseregülő monocyták a baktériumok különböző alkotóelemeinek – pl. a Gram-negatívok sejtfalában található lipopoliszacharidok – hatására citokinek kezdenek el termelni. Ezek a citokinek a gyulladásban betöltött szerepükön kívül olyan katabolikus folyamatokat indítanak el, amelyek a kollagénrostok szétesését, valamint az alveolaris csont felszívódását okozzák. Ebben a folyamatban a neutrophil granulocyták granulumaiban található matrix metalloproteináz enzim is fontos szerepet játszik (1, 5).

A gyulladás kollagénrost-széteséshez és az alveolaris csont felszívódásához vezet

Az ismertetett folyamatok szerint a periodontalis szövetek pusztulásának hátterében inkább a gazdaszervezet immunreakciója áll, nem pedig a parodontogén baktériumokból felszabaduló toxikus anyagcsere-termékek közvetlen hatása. A kötőszövet károsodása kezdetben az íny leválásaként jelenik meg, az egyre mélyülő ínnyasok pedig az anaerob viszonyoknak kedveznek. A károsodás idővel a fogakat rögzítő további képletekre is kiterjed. Függetlenül, majd vízszintes alveolaris csontvesztés, ill. a periodontalis szalagok gyengülése figyelhető meg, amelynek következtében a fog meglazul, táplálkozásra, rágásra alkalmatlanná válik (1, 5). Ezekkel a folyamatokkal párhuzamosan megindul a fogkorona felszínén a fogkő képződése is, amely súlyosbítja a kórfolyamatot (5). Ezekon a kórfolyamaton túlmenően a halitosis megjelenéséért is a megemelkedett számú, fekete pigmentet termelő baktériumok felelősek. Ezek a mikroorganizmusok illékony kénvegyületeket (VSC = Volatile Sulfur Compounds) termelnek, amelyek mind az állatok, mind pedig az emberek esetében kellemetlen szájzsagot eredményeznek (22).

Kezdetben az íny leválása látható, a fogkőképződés pedig súlyosbítja a kórfolyamatot

A helyi elváltozásokon kívül a szisztémás szövődmények is számottevőek, mint pl. máj- és vesebetegségek, szívbelhártya-gyulladás, atrioventricularis szívbillentyű-elégtelenség, atherosclerosis-szerű elváltozások, ill. a II. típusú diabetes mellitus. GLICKMAN és mtsai az emberi esetekhez hasonlóan, szignifikáns összefüggést találtak a kutyák parodontitise és a következményes cardiovascularis megbetegedések – pl. az endocarditis és a cardiomyopathia – előfordulása között (5, 7).

BAKTERIÁLIS HÁTTÉR

A kutyák parodontitisében résztvevő anaerob mikroorganizmusokat már korábban is vizsgálták, azonban az elsődleges cél inkább az emberi fogágygyulladással kapcsolatos baktériumflóra részletesebb, sokrétűbb elemzése, valamint a kutyaharapásokkal összefüggésbe hozható bakteriális fertőzések kivizsgálása volt. Ezenkívül a kutyákat modellállatként gyakran igénybe veszik az emberi parodontitis kórfejlődésének vizsgálatára is. Több tanulmány igazolta, hogy a kutyák fogágygyulladásában szereplő tényezők sok esetben hasonlóak az emberekben leírtakhoz. A kórélettani folyamatokon és a betegség kórszövettani jellemzőin kívül, a bakteriális háttér is nagyon hasonló, bár lényeges különbségek is előfordulnak. A fekete pigmentet termelő *Porphyromonas*-fajok mind kutyák mind emberek esetében központi szerepet játszanak a betegség kialakulásában. Amíg az emberi esetekben leggyakrabban a kataláz-negatív *Porphyromonas gingivalis* izolálták, addig számos állatból – kutyából, majomból, jaguárból, juhból, macskából és mosómedvéből – a korábban még ebbe a fajba sorolt baktérium kataláz-pozitív biotípusát mutatták ki. Több, DNS-vizsgálatokon alapuló tanulmány is kimutatta, hogy a két biotípus között olyan mértékű a genetikai különbség, amely már indokolhatja egy új faj bevezetését. Ebből a megfontolásból FOURNIER és mtsai 2001-ben az addig publikált adatokat, valamint a saját vizsgálatuk adatait – úgymint a morfológiai, biokémiai, fiziológiai és genetikai elemzés eredményeit – összevetve az állatokból izolált kataláz-pozitív *Porphyromonas gingivalis* új fajba sorolták, amely a *Porphyromonas gulae* nevet kapta. Ellentmondásosnak tűnhet, hogy egy obligát anaerob baktérium kataláz enzimet termel. Gyakorlati szempontból elmondhatjuk, hogy a szuperoxid-dizmutáz, a kataláz és a peroxidáz enzimek szabályozott folyamatban, „együttműködve” gondoskodnak az oxigéntartalmú toxikus szabadgyökök semlegesítéséről. Ebből az következik, hogy oxigén jelenlétében a szaporodáshoz mindhárom enzim termelésére kellő mennyiségben szükség van. Számos obligát anaerob (tehát oxigén jelenlétében nem szaporodó) baktériumcsoport egy-két fajtát a fent említett enzimekből kis mennyiségben termelhet. Ezek a baktériumok általában a minimális oxigén jelenlétét elviselik, de nem szaporodnak (aerotolerancia). Ilyenek tehát az egyébként obligát anaerob *Porphyromonas gulae* faj törzsei is (1, 2, 3, 4, 9, 15, 19).

Az emberekből származó kataláz-negatív *P. gingivalis* parodontopatogén hatásával, ill. szerepével a betegség kórfejlődésében már számos tanulmány foglalkozott. Kimutatták, hogy ezek a baktériumok számos virulenciafaktorral rendelkeznek, mint pl. a kollagenázok, lipopoliszacharidok, tripszin-szerű proteázok, valamint a baktériumok felületén található fimbriák. Néhány kutatás igazolta, hogy a *P. gingivalis* fimbriái segítségével képes más baktériumokhoz, vörösvértestekhez, ill. hámsejtekhez kötődni. Ez a kötődés esszenciális lépése a parodontitis kialakulásának. A fimbriák egy 41 kDa-os alegység fehérjéből, a fimbrillinből (FimA) állnak, amelyek lényeges résztvevői a fogágygyulladás progressziójában. A tapadási és az inváziós képességen túl ezek a fimbriák az ember immunrendszerét is stimulálják, amelynek hatására a perifériás macrophagok és neutrophil granulocyták esetében a gyulladással kapcsolatos citokinek (IL-1, IL-6, és a TNF- α) termelése fokozódik. A *P. gulae* esetében még nem tisztázták a mikroorganizmusok tapadó és kolonizációs képességét a szájüregben. HAMADA és mtsai által készített tanul-

A kutyákat gyakran igénybe veszik modellállatként az emberi parodontitis kórfejlődésének vizsgálatára is

A kataláz-pozitív *Porphyromonas gingivalis* mellett kutyában leírták a kataláz-negatív *P. gulae*-t is

mány során megvizsgálták a *P. gulae* és a *P. gingivalis* fimbriái közötti molekuláris és antigenitásbeli hasonlóságokat. A *P. gulae* esetében is egy 41 kDa-os fimbriaalegység fehérjét sikerült izolálniuk SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis) segítségével. A *P. gulae* fimbrillinjét kódoló fimA gén és a *P. gingivalis* fimA génje között 94%-os homológiát mutattak ki a gének nukleotid-szekvenciája alapján. A *P. gingivalis* fimbrillinje ellen termeltetett ellenanyag keresztreakciót mutatott a *P. gulae* fimbrillinjével, ennek megfelelően a *P. gulae* fimbriái ugyanolyan antigenitással rendelkeznek, mint a *P. gingivalis* felületén található fimbriák. Ezen kívül a *P. gulae* is képes kötődni az emberi ínyszövetből származó hámsejtekhez, habár a *P. gingivalis*hoz képest ez kevésbé kifejezett. Ezek alapján a *P. gulae* felületi szerkezete nagyban hozzájárul ezeknek a mikrobáknak a megtelepedéséhez háziállataink ínytasakjában (8).

A *Porphyromonas gulae* kívül számos egyéb, a kutyák fogágygyulladásában résztvevő *Porphyromonas*-fajt írtak le az utóbbi évtizedekben, pl. a *P. macacae*, *P. cansulci*, *P. cangingivalis*, *P. gingivicanis*, *P. crevioricanis*, *P. canoris*. A *P. macacae* 1995-ig a *Bacteroides* genusba tartozott, amikor is a genetikai és biokémiai tulajdonságai révén átsorolták a *Porphyromonas* nemzetségébe. Ezeket a baktériumtörzseket az állatok szájüregén kívül már bőr alatti tályogokból, ill. pyothoraxból származó mintákból is kimutatták (4, 10, 20, 21, 25).

Kato és mtsai is készítettek egy tanulmányt azzal a céllal, hogy megvizsgálják a kutyák fogágygyulladásában szerepet játszó patogén baktériumok megoszlását. A vizsgálat során 35 *Porphyromonas*-törzset találtak, legnagyobb arányban, kb. 70%-ban *P. gulae*-t mutattak ki. Találtak ezen kívül még olyan kórokozókat is, amelyek az emberi parodontitis kialakulásában játszanak fontos szerepet, mint a *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Capnocytophaga ochracea*, *Prevotella intermedia* és *Eikenella corrodens*. Ez az eredmény felvetette annak a valószínűségét, hogy ezeket a parodontogén fajokat a tulajdonosok átadhatják a kutyáiknak, ha elég szoros kapcsolatban élnek együtt, hasonlóan ahhoz, amikor a szülők a gyerekeiknek adnak át parodontogén kórokozókat (19).

A kutyák és tulajdonosaik közötti parodontogén baktériumok átadásának lehetőségét 2012-ben egy Japánban készült tanulmányban vizsgálták. A kísérlet során a patogén baktériumoknak a megoszlását elemezték a gazdákból és a kutyáikból vett szájüregi minták alapján. A vizsgálat eredményeit összegezve valószínűsíthető az az elmélet, miszerint bizonyos parodontogén baktériumok átjuthatnak a tulajdonosoktól a kutyáikba és fordítva, habár ezeknek a baktériumoknak a két faj esetén rendszerint eltérő a megoszlása (26).

Bizonyos parodontogén baktériumok átjuthatnak a tulajdonosoktól a kutyáikba és fordítva

Legfontosabb a lepedék és a fogkő kialakulásának a megelőzése

MEGELŐZÉS ÉS KEZELÉS

A parodontitis elleni küzdelem alappillére a megelőzés, aminek két legfontosabb eleme a lepedék és a fogkő kialakulásának a megelőzése. Napjainkban már számos módszer elérhető, olyanok is, amelyeket a tulajdonos otthoni körülmények között is alkalmazni tud. Az egyik ilyen – a leghatékonyabb és legolcsóbb – módszer a fogmosás, a másik pedig a különböző fogászati javallattal rendelkező tápok és fogtisztító jutalomfalatok rendszeres etetése (5, 16).

A már kialakult parodontitis kezelésének egyetlen lehetősége az állatorvosi rendelőben, altatásban elvégzett szájhigiéniai beavatkozás, amelynek során a subgingivalis régiókat kézi, a supragingivalis régiókat pedig gépi depurátorral megtisztítjuk, valamint a kilazult fogakat, mint bakteriális góccokat eltávolítjuk. A beavatkozást szükség esetén gyógyszeres kezeléssel, antibiotikumok és gyulladáscsökkentők adásával egészítjük ki (5).

A fogászati beavatkozások során rutinszerűen nem alkalmazunk szisztémás antibiotikumokat. Bizonyos esetekben viszont indokolt a szisztémás antibiotikum-kezelés, ezek a következők: súlyos fokú parodontitis, nagy kiterjedésű

A már kialakult fogágygyulladás altatásban elvégzett szájhigiéniai beavatkozást igényel

Súlyos esetekben szisztémás antibiotikum-kezelés is ajánlott

szájüregi fekélyek, vérzéssel járó szájsebészeti műtétek, idült szív-, máj-, légzőszervi és vesebetegségek, implantátumok, primer immunopathiák, valamint folyamatban lévő immunszuppresszív kezelések. Mivel napjainkban egyre nagyobb gondot jelent az antibiotikum-rezisztencia kialakulása, az antibiotikum-kezelés a lehető legrövidebb ideig, a leghatékonyabb szerrel és megfelelő adagban kell alkalmazni. Fontos azonban megemlíteni, hogy a gyógyszeres kezelés a megfelelő szájhygiéniás beavatkozás nélkül eredménytelen. A nem laktamázstabil antibiotikumok alkalmazása nem jó választás, mert a szájüregi patogének általában β -laktamázt termelnek (5).

A laktamázstabil kombinációk közül leggyakrabban amoxicillin-klavulánsavat alkalmazunk. Ez a hatóanyagkombináció a nyálban és a jó vérellátású szövetekben nagy koncentrációban jelenik meg, bár az idült gyulladással barriereken csekély mértékben jut át. A szájüregben lévő anaerob mikroorganizmusok ellen hatásos, valamint az aerob baktériumokkal szemben is eredményes. Hátránya viszont az, főleg megelőző alkalmazás során, hogy szelektálja a polirezisztens Gram-negatív pálcákat, főleg az *Enterobacteriaceae* családhoz tartozó coliform baktériumokat. Ez elsősorban nem a fogágygyulladás miatt jelent problémát, hanem a mikrokörnyezetre és a távoli szervekre jelenthet veszélyt (5).

Másik lehetséges választás a szájüregi beavatkozásokat követő kezelésre a *klindamicin*. Ez az antibiotikum jobban áthatol a gyulladással szövetekben, megfelelő koncentrációt ér el a gennyes, elhalt területeken is, mikrobiológiai hatékonysága azonban elmarad a fent említett kombinációval szemben. Bár a *Porphyromonas* és *Prevotella* fajok ellen hatékonyan bizonyult, a szájüregben található más baktériumoknál, pl. az állandó szájflórát alkotó *Pasteurella*, *Moraxella*, továbbá a változó flórát alkotó *Enterobacteriaceae* családhoz tartozó fajoknál genetikai rezisztencia figyelhető meg. A *Bacteroides fragilis* csoport törzsei, valamint a staphylococcusok az esetek jelentős részében (> 30%) rezisztensek. Ezek a szelektálódott törzsek egy rossz szájhygiéniás állapotot konzerválnak, ráadásul további másodlagos fertőzésekben vehetnek részt (5).

További lehetséges és hatékony gyógyszerkombináció a *spiramicin* és a *metronidazol*. A fertőzés helyén jelentős koncentrációt ér el, és szinte az összes szájüregi aerob és anaerob baktérium ellen hatásos (5).

A fogágygyulladás kezelésében rutinszerűen még nem alkalmazott *pradofloxacin* egy ígéretes választás a *Porphyromonas* és *Prevotella* genus tagjai elleni küzdelemben. Ez a negyedik generációs fluorokinolon a kiváló áthatólképessége és a magas sejten belüli koncentráció kialakítása mellett az anaerobokkal és a staphylococcusokkal szemben is baktericid hatást fejt ki, ellentétben a második generációs szerekkel. Ezenfelül a fluorokinolon-rezisztens mutáns törzset csekély mértékben szelektálja (5).

ANYAG ÉS MÓDSZER

A VIZSGÁLT ÁLLATOK

Vizsgálatunkat 2015–2016. évben az Állatorvostudományi Egyetem Sebészeti és Szemészeti Klinikáján végeztük. 59 kutya szájüregéből összesen 150 bakteriológiai mintát gyűjtöttünk. A vizsgálatba bevont kutyákat a szájüregi higiéniájuk alapján választottuk ki, kortól, nemtől és fajtától függetlenül, azonban minden esetben teljesülnie kellett bizonyos kritériumoknak. Azok a kutyák, amelyek a mintavétel előtti 4 hétben valamilyen antibiotikum-kezelést kaptak, nem vehettek részt a vizsgálatban. Kizáró oknak számított az is, ha az állat szájüregét két héten belül helyi antiszeptikus készítménnyel, pl. klórhexidinnel kezelték, ill. ha az elmúlt egy hétben bármilyen szájhygiéniás terméket kapott. Ide tartoznak a különböző kutyáknak szánt fogkrémek, fogtisztító gélek, ill. azok a termékek is, amelyek természetes esszenciális olajokat, valamint fenolokat tartalmaznak.

A leggyakrabban alkalmazott antibiotikumok:

- amoxicillin-klavulánsav
- klindamicin
- spiramicin és metronidazol

A szerzők 59 kutya szájüregéből összesen 150 bakteriológiai mintát gyűjtöttek

**A mintagyűjtés
általános
anesztéziában történt**

**Kutyánként 1–4 mintát
vettek**

**A mintákat az ínnytasak-
ból vették papírcsúcsok
segítségével**

A MINTAVÉTEL MÓDJA

A mintagyűjtés általános anesztéziában történt. Kutyánként 1–4 mintát vettünk le, egyedenként több minta esetén különböző negyedekből (bal alsó, bal felső, jobb alsó és jobb felső) egyet-egyet. Mivel a parodontitis súlyossága foganként eltérő mértékű lehet, ezért a rossz általános szájhygiénájú állatoknál egy minta nem reprezentálta volna megfelelően a szájflóra összetételét. A vizsgálat-hoz kifejezetten olyan kutyákat kerestünk, amelyek közepesen súlyos, ill. súlyos parodontitisben szenvedtek. A mintavétel során a kiválasztott fogak felszínéről és az ínnyselekről egy gézlappal eltávolítottuk a lepedéket, majd a felületet steril Salsol infúziós oldattal megtisztítottuk. A fog ínnytasakjába egy steril papírcsúcsot toltunk és tíz másodperig benne hagytuk, majd csipesszel eltávolítottuk és transzporttáptalajt tartalmazó, hermetikusan lezárható csőbe helyeztük. Minden egyes vizsgált fog ínnytasakjából dupla mintát vettünk, de ezeket a mintákat egy táptalajba helyeztük (1. ábra). A vérrel kontaminálódott mintákat nem küldtük el tenyésztésre, mert a vér jelenléte csökkenti az anaerobok életképességét.

Minden kutya esetében kitöltöttünk egy adatlapot, amely az állatok és a minták legfontosabb jellemzőit tartalmazta. A lapon a tulajdonos lakhelye (város és irányítószám), a kutya fajtája, kora, ivara, ill. a kiválasztott fogak megnevezése (Triadan rendszer szerint) és a parodontitis súlyossága szerepelt. A kettes fokozatú parodontitis a közepesen súlyos, a hármas fokozatú pedig a nagyon súlyos fogágygyulladást jelöli (módosított British Small Animal Veterinary Association protokoll) (2. ábra, 3. ábra). Az állatok életkora és a parodontitis súlyossága között feltételezett pozitív korrelációt R programban Fisher-féle egzakt próbával és chí-négyzet teszttel vizsgáltuk.

A kutyák adatlapjait és a mintákat lehetőség szerint azonnal (péntek délutáni mintavétel esetén csak hétfőn reggel) a Duo-Bakt Állatorvosi Mikrobiológiai Laboratóriumba küldtük tenyésztésre. A Gram-negatív anaerob baktériumok a transzporttáptalajban, anaerob viszonyok között ellenállóak. Ebben a formában életképességüket hosszabb ideig megőrzik, így ez az időtartam összeségében nem befolyásolta a kapott eredményeinket.



1. ÁBRA. Mintavétel az ínnytasakból papírcsúcsok segítségével

FIGURE 1. Microbiological sampling from the subgingival sulcus using paper points



2. ÁBRA. Kettes fokozatú fogágygyulladás

FIGURE 2. Grade 2 periodontitis



3. ÁBRA. Hármas fokozatú fogágygyulladás

FIGURE 3. Grade 3 periodontitis

**A tenyésztés leginkább
Porphyromonas, ill.
Prevotella baktériumok
izolálását célozta**

A TENYÉSZTÉS MENETE

A laboratóriumban a papírcsúcsok feldolgozása körülbelül 8–10 napot vett igénybe. A minták olyan többlépcsős tenyésztési folyamaton estek át, amely során a változatos szájüregi flórából *Porphyromonas*, ill. *Prevotella* szintenyészeteket kívántunk létrehozni. Az anaerob baktériumok tenyésztésének fontos eleme, hogy az anaerob tenyészeteken kívül ugyanabból a mikrobiológiai

**Az anaerob tenyésztésre
8% juhvért tartalmazó,
ún. Wilkins–
Chalgren-agart
használtak**

**Minden esetben készí-
tettek még egy kísérő
aerob tenyészetet is**

mintából párhuzamosan aerob kísérő tenyészeteket is készíteni kell. A mintában jelen levő nagyszámú fakultatív anaerob mikroorganizmus megnehezítette a porphyromonasok és prevotellák izolálását, de a kísérő aerob tenyészetek a munkafolyamat folyamatos ellenőrzését lehetővé tették. Az anaerob tenyésztés első lépéseként a transzporttáptalajt tartalmazó csőben levő egyik papírcsúcsot – előzőleg gázégő felett leégetett steril oltókaccsal – eltávolítottuk és egy általános anaerob baktériumok tenyésztésére alkalmas, 8% juhvért tartalmazó véresagaron, ún. Wilkins–Chalgren agaron (Bak-teszt Kft., Budapest, Magyarország) kiszélesztettük.

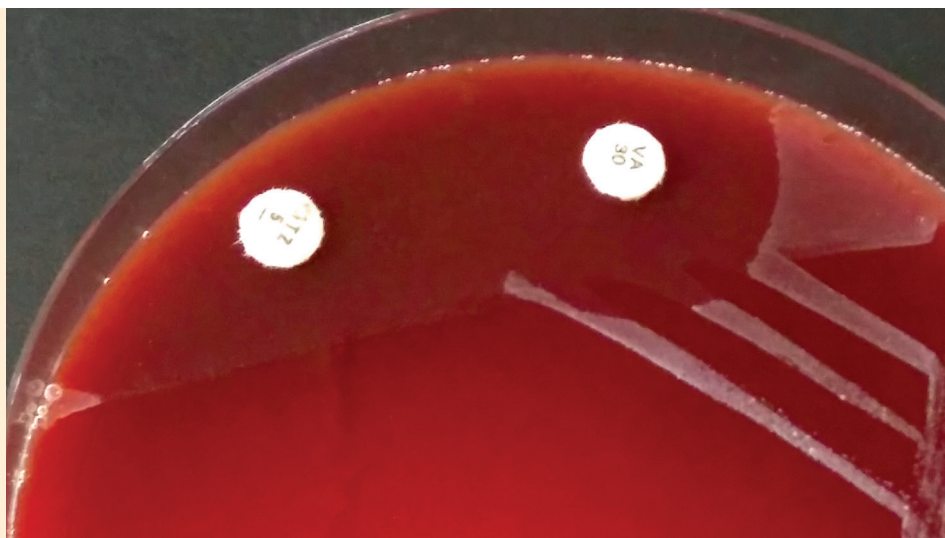
Ezután a sűrű leoltásba felhelyezettünk egy metronidazolt és egy vankomicint tartalmazó papírcorongot (4. ábra). A vankomicinre a Gram-pozitív baktériumok érzékenyek, ezért ezzel az antibiotikummal biztonságosabban el tudtuk különíteni a Gram-pozitívakat a Gram-negatívaktól. A metronidazol az anaerob és a fakultatív anaerob baktériumok elkülönítésében ad segítséget. Fontos megjegyeznünk, hogy a módszer nem érzékenységi vizsgálatként értelmezendő, hanem a két korong az eredeti mintaösszetétel felmérésében nyújt komoly támpontot. Az első papírcsúcsból készítettünk még egy kísérő aerob tenyészetet is, amelyet egy közönséges véresagarra oltottunk le. Ennek a kísérő aerob véresagarnak az a szerepe, hogy képet adjon az adott minta baktériumflórájának gazdagságáról. Egy előrehaladottabb, gennyes parodontitisnél erősen kevert flóra található a szájüregben, így a porphyromonasok és prevotellák elkülönítése nehezebbé válik. Amennyiben az első kísérő aerob tenyészet egy gazdagabb flórával rendelkező mintára utal, úgy a későbbiekben nagyobb lesz a hibázási lehetőség, amikor a telep morfológia alapján próbáljuk meg elkülöníteni a kívánt baktériumokat. A második papírcsúcsot egy nalidixsavat és colistin tartalmazó véresagarra oltottuk le (Columbia CNA™, bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). A nalidixsav 15 mg/l, a colistin 10 mg/l koncentrációban található a táptalajban, így hatékonyan gátolja a fakultatív anaerob Gram-negatív baktériumok, pl. a kutyák szájában nagy számban előforduló *Enterobacteriaceae* család, valamint a *Bacillus* genus a szaporodását. A paradontopatogén anaerobok viszont nem pusztulnak el, ezzel is megkönnyítve a számunkra lényeges baktériumok növekedését és a későbbi azonosítását.

4. ÁBRA. Anaerob baktériumtenyészet

Az 5–7 napos inkubációt követően láthatóak metronidazol és a vankomicin körül kialakult gátlási zónák

FIGURE 4. Anaerobe microbial culture

Zone of inhibition (clear zone) can be seen around metronidazole and vancomycin disks after 5–7 days of incubation



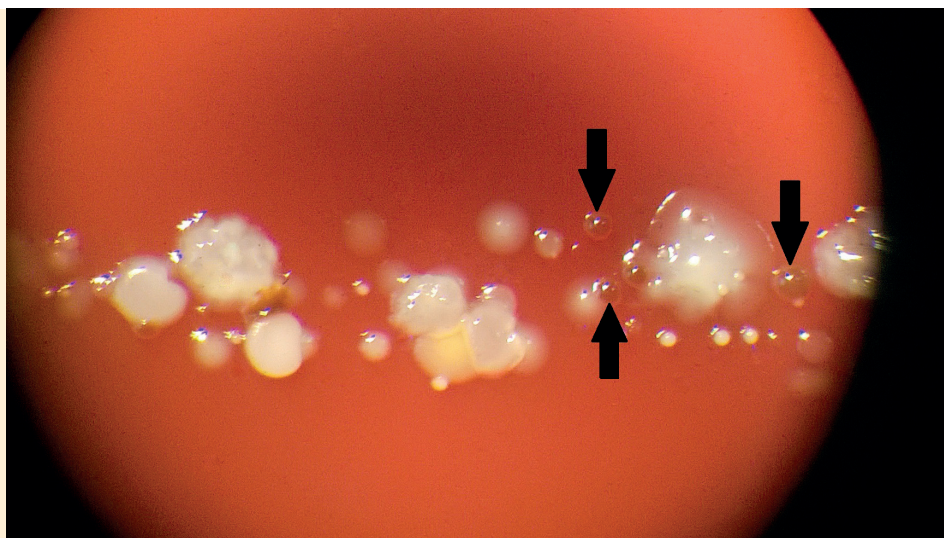
Az anaerob viszonyok kialakítása gázgenerátor-tasakkal történt (Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, Franciaország). A táptalajokat 5–7 napig inkubáltuk 35 °C-on. Ez idő alatt a porphyromonasok és prevotellák ki tudták fejleszteni azokat a jellegzetes tulajdonságaikat, amelyek alapján könnyebben elkülöníthetőek a

tenyészetből, úgy mint a telepek sajátos alakja és a különböző színű – fekete, ill. zöld – pigmentek termelése. Az anaerobitás ellenőrzése során kettős ellenőrzést, egyrészt kémiai, másrészt biológiai módszert alkalmaztunk. Az utóbbira a kontroll obligát anaerob *Bacteroides fragilis* törzs metronidazollal szembeni érzékenységi tesztje szolgál (6, 17).

Az inkubációs idő elteltével megtörtént az anaerob közeg felbontása. Ezt követően a tenyészeteket 2,5–4-szeres nagyításban vizsgáltuk meg sztereomikroszkóppal és a gyanúsnak tűnő, tehát a telepmorfológia alapján *Porphyromonas*nak vagy *Prevotellának* vélt telepeket steril oltótűvel leszedtük és egy új Wilkins-Chalgren agaron kiszélesztettük (5. ábra). A leszedett telep morfológiáját leírtuk, dokumentáltuk, amely a későbbi nyomon követhetőséget megkönnyítette. Amennyiben tisztán dolgoztunk és csak egy, az általunk kiválasztott telepet oltottuk le az új táptalajra, akkor az inkubációs idő elteltével szintenyészetet kaptunk.

5. ÁBRA. *Porphyromonas*nak vagy *Prevotellának* tűnő, apró zöldesfekete telepek sztereomikroszkóppal vizsgálva (nyilak)

FIGURE 5. Greenish-black bacterial colonies appear through stereomicroscope. According to the morphology they might be colonies of *Porphyromonas* or *Prevotella* strains (arrows)



Az előzetes beazonosítás antibiotikumokat, ill. epesavas sókat tartalmazó korongok segítségével történt

A kiszélesztést egy ún. előzetes beazonosítás követte, amelynek során az agarlemezre öt darab papírkorongot helyeztünk fel, ebből négy darab különböző antibiotikumokat (vankomicint, kanamicint, colistint és metronidazolt) egy pedig epesavas sókat tartalmazott (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK). A korongok elhelyezése után az agarlemezeket ismételtén gázgenerátor tasakok segítségével anaerob közegben inkubáltuk. Ebben az esetben az inkubációs idő már csak 3 napot vesz igénybe, mivel optimális esetben csak egy baktériumfaj található meg a táptalajon, ezáltal az hatékonyabban és hamarabb képes növekedni, telepet képezni. A szintenyészetek kialakítására kiválasztott baktérium-telepekből készítettünk egy második, kísérő aerob tenyészetet is, szintén közönséges véresagarra kiszélesztve. Ennek az volt a célja, hogy meggyőződjünk arról, hogy az általunk kiválasztott és anaerobnak vélt baktérium-telepek valóban tisztán csak anaerob mikrobákat tartalmaznak. Ez az aerob kísérő tenyészet már másnap elbírálható. Abban az esetben, ha ezen a táptalajon kinő valamilyen baktérium, akkor a szintenyészetünk kialakítása sikertelen volt és ennek az agarlemeznek az anaerob párja előzetes azonosításra alkalmatlan.

A 3 napos inkubációs időt követően megtörtént a baktériumtelepek előzetes beazonosítása, amelynek során az egyes antibiotikumok, ill. az „epekorong” által létrejött gátlási zónák alapján következtettünk arra, hogy az adott szintenyészetet alkotó baktériumok mely genusba, esetleg fajba sorolhatóak. A besorolás az 1. táblázat szerint történt. A táblázatban külön nem tüntettük fel a metronidazolra vonatkozó adatokat, mivel az anaerob baktériumok általában érzékenyek erre az antibiotikumra (17).

A megfelelő törzseket MALDI-TOF-módszerrel azonosították, majd az antibiotikum-érzékenységi vizsgálat következett

Az eredmények kiértékelése után azokkal a tenyészetekkel, amelyek megfeleltek a táblázatban a porphyromonasokra, ill. prevotellákra leírt mintázatoknak, tovább dolgoztunk (6. ábra). Először leoltást készítettünk egy ún. Microbank tároló rendszerre, amelynek segítségével ezek a baktériumtörzsek hosszabb ideig fagyott állapotban eltárolhatók további vizsgálatok céljából (Prolab, Richmond Hill, Kanada). Miután elkészültek ezek a leoltások, a fennmaradó agarlemezeket tovább küldtük a Semmelweis Egyetemre, ahol Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight (MALDI-TOF) tömegspektroszkópiás módszer segítségével elvégezték a baktériumok végleges azonosítását (14, 18, 24).

A végleges azonosítást követően a Microbank rendszerben tárolt, fagyott baktérium-törzseket a németországi Bad Kissingenbe küldtük, ahol a Bayer Animal Health GmbH. megbízásából a független és akkreditált Laboklin állatorvosi mikrobiológiai laboratórium (DIN EN ISO / IEC 17025:2005 D-PL-13186-01-00) antibiotikum-érzékenységi vizsgálatokat végzett.

1. TÁBLÁZAT. Baktériumok elkülönítése gátlási zónák alapján

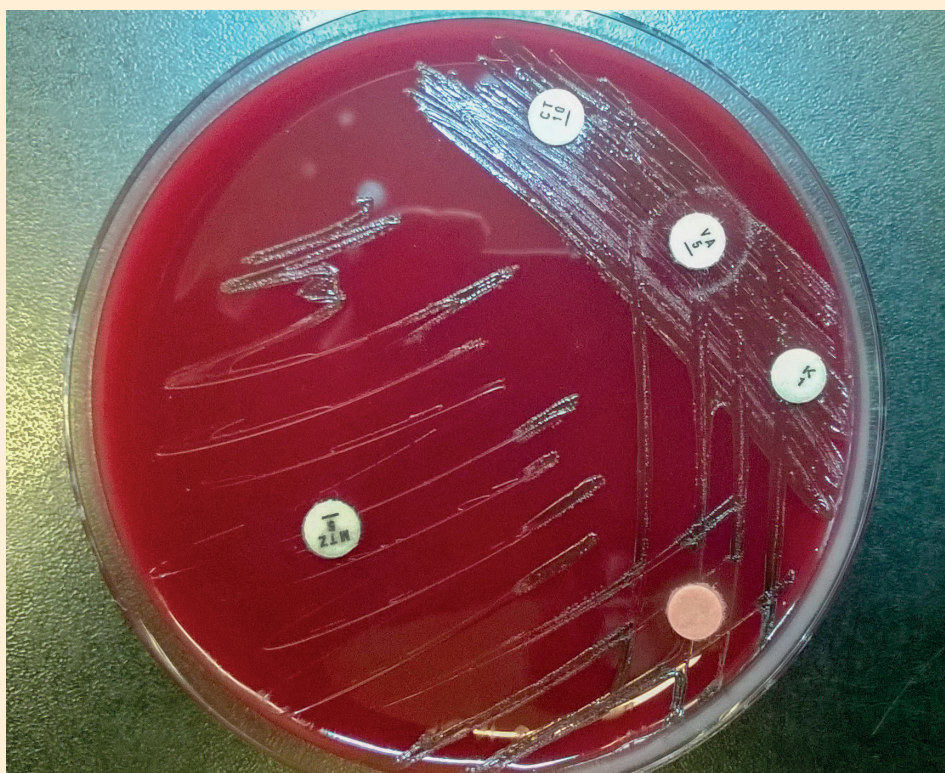
TABLE 1. Identification of bacteria according to the zones of inhibition

	vankomicin	kanamicin	colistin	epesavas sók
<i>Bacteroides fragilis</i>	R	R	R	+
egyéb <i>Bacteroides</i> fajok	R	R	V	-+
Pigmentált fajok	V	R	V	-
<i>Porphyromonas</i> spp.	É	R	R	-
<i>Prevotella</i> spp.	R	R ^É	V	-
<i>P. intermedia</i> , <i>P. nigrescens</i>	R	R ^É	É	-
<i>P. loescheii</i>	R	R	V	-

R: rezisztens É: érzékeny V: változó +: epesavas sók serkentik a növekedést -: epesavas sók gátolják a növekedést

6. ÁBRA. *Porphyromonas* spp. színtenyészet

FIGURE 6. Pure culture of *Porphyromonas* spp.



EREDMÉNYEK

A vizsgálatunk során összesen 59 kutya (26 szuka és 33 kan) ínytasakjából 150 darab bakteriológiai mintát vettünk. Alanyaink többsége kistestű, bichon bolognese, bichon havanese, yorkshire terrier, törpe uszkár, tacsikó keverék kutya volt, de előfordultak közepes, ill. nagytestű fajták is, mint pl. magyar vizsla, német juhász, berni pásztor, perzsa agár. A kutya életkora 1 és 15 év között mozgott, az átlag életkor 9 év volt. A parodontitis súlyossága 39 esetben 2-es, 20 esetben pedig 3-as fokozatú volt.

Az előrehaladott parodontitis leginkább az idősebb korosztályt érintette. A 12 éves korú kutyaiból volt a legnagyobb esetszámunk és a 3-as fokozatú fogágygyulladások előfordulása ebben a korosztályban volt a legmagasabb. A legfiatalabb, 3-as fokozatú parodontitissel rendelkező kutya egy 3 éves kan mopsz volt. A szemmel látható tendenciák ellenére a Fisher-féle egzakt próbával és a chí-négyzet teszttel végzett függetlenségvizsgálat eredményei azt mutatták, hogy az általunk vizsgált kutya életkora és a fogágygyulladás előfordulása között nem áll fenn szignifikáns pozitív korreláció ($p = 0,3221$).

Munkánk során 72 mintából sikerült valamilyen *Porphyromonas* vagy *Prevotella* fajt izolálni, a maradék 78 esetben vagy nem tenyésztett ki a vizsgálni kívánt baktérium vagy számunkra nem lényeges baktériumok pl.: *Bacteroides fragilis*, nőtt ki a táptalajon. A 72 mintából összesen 76 baktériumtörzset azonosítottunk, ebből 74 a *Porphyromonas*, 2 pedig a *Prevotella* genusba – *Prevotella nigrescens* és *Prevotella pallens* – tartozott (diagram, 2. táblázat).

Az azonosított törzseken Bad Kissingenben, a Laboklin állatorvosi mikrobiológiai laboratóriumban antibiotikum-érzékenységi vizsgálatokat végeztek, ahol meghatározták az egyes baktériumfajok MIC (Minimal Inhibitory Concentration) értékeit a pradofloxacin, az amoxicillin-klavulánsav, a klindamicin, és a metronidazol vonatkozásában. A 76 baktériumtörzsből 56 esetben sikerült elvégezni ezeket a vizsgálatokat. A maradék 20 törzsnél valamilyen oknál fogva háromszori próbálkozás után sem sikerült a Microbank tároló rendszerből a színtenyészeteket újból kialakítani. Ezek az anaerob baktériumok az izolálási és tartósítási eljárás során valószínűsíthetően elpusztultak. A kapott MIC-értékeket, valamint az EUCAST (European Committee on antimicrobial susceptibility testing) által és a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) által meghatározott MIC-határértékeket összevetve az általunk vizsgált baktériumoknál a pradofloxacinnal és az amoxicillin-klavulánsav kombinációval szemben nem fordult elő rezisztencia. A maradék két hatóanyaggal szemben viszont 5 minta – a klindamicin esetén 2 minta, a metronidazol esetén pedig 3 minta – esetén volt megfigyelhető rezisztencia (12, 13) (3. táblázat).

Az előrehaladott parodontitis leginkább az idősebb korosztályt érintette

72 mintából összesen 76 baktérium-törzset azonosítottak

A rezisztenciavizsgálatokat 56 törzs esetében sikerült elvégezni

Pradofloxacinnal és az amoxicillin-klavulánsav kombinációval szemben nem fordult elő rezisztencia

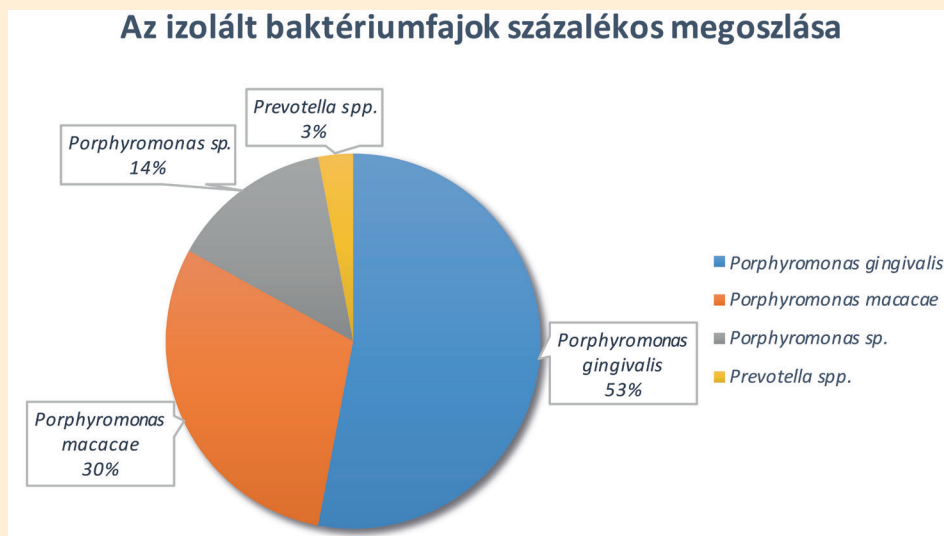
2. TÁBLÁZAT. Az izolált baktériumtörzsek száma

TABLE 2. Totality of the isolated bacterial strains

Baktérium fajok	darab
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	40
<i>Porphyromonas macacae</i>	23
<i>Porphyromonas sp.</i>	11
<i>Prevotella pallens</i>	1
<i>Prevotella nigrescens</i>	1
összesen	76

DIAGRAM. Az izolált baktériumfajok százalékos megoszlása

DIAGRAM. Percentage distribution of the isolated bacterial strains



3. TÁBLÁZAT. MIC határértékek

TABLE 3. MIC breakpoints

MIC-határérték (mg/l)	Érzékeny ≤	Rezisztens >
Pradofloxacin	0,25	≥2
AMC	4	8
Klindamicin	4	4
Metronidazol	4	4

Az izolált törzsek több mint fele *P. gingivalis* volt, de feltételezhetően ezek egy része *P. gulae* lehetett a két faj hasonlósága miatt

MEGVITATÁS

Az ember és a kutyák parodontitisének is egyik kulcsfontosságú kórokozója a *P. gingivalis*. A korábban egy fajként, de két biotípusként számontartott emberi eredetű *P. gingivalis*t és az állati eredetű *P. gingivalis*t 2001-ben kettéválasztották, az állatokból izolált *P. gingivalis*t új fajba sorolták, amely a *P. gulae* nevet kapta. Több tanulmány is leírta ennek a baktériumfajnak a nagyarányú előfordulását a kutyák fogágygyulladására kapcsán (1, 5, 9, 19, 23). Az általunk izolált törzsek több mint fele *P. gingivalis* volt, ami ellentétben állhat a frissebb szakirodalmi adatokkal. Az a felvetésünk, hogy az eredményeink nagy hányadában nem a humán patogén *P. gingivalis*t, hanem az állatokból származó *P. gulae*t mutattuk ki. Ennek a felvetésnek az alapja a MALDI-TOF működésében keresendő. A MALDI-TOF az általa feldolgozott minta tömegspektrumát összeveti az adatbázisában található baktériumok tömegspektrumával. Amennyiben két baktérium között szoros rokonság van és a tömegspektrumuk nagyon hasonló, azonban az adatbázisban csak az egyik baktérium fehérjeprofilja szerepel, a tömegspektrométer összetévesztheti a két baktériumot. Az a véleményünk, hogy ebben az esetben is ez történhetett, tehát az általunk azonosított *P. gingivalis* nagy része valójában *P. gulae* volt. Azonban nem jelenthetjük ki azt, hogy az eredményeinkben szereplő összes *P. gingivalis* valójában a *P. gulae* fajba tartozna. Korábban már leírták a tulajdonosok és kutyáik közötti parodontogén baktériumok átjutásának lehetőségét szoros napi kontaktus esetén, bár az emberi eredetű *P. gingivalis* csak kis százalékban fordult elő a kutyák szájüregében (19, 26).

Ezen szakirodalmi adatokra alapoztuk a felvetésünket, miszerint egy-egy esetben a tömegspektrométer valóban az emberi *P. gingivalis* azonosította. Ennek a problémának a kiküszöbölésére az egyes baktériumokra megállapított pontértékek vizsgálatával lehetne megoldást találni. Ezek olyan értékek, amelyek a vizsgálandó minta tömegspektruma és az adatbázisban szereplő tömegspektrum közti hasonlóságot írják le. A készülék szoftvere egy bizonyos intervallumon belül azonos baktériumfajba sorolja be az adott mintát, viszont a közelálló értékeket nem mindig tudja elkülöníteni egymástól. Mivel ezek az értékek nem állnak rendelkezésünkre, ennek a kérdésnek a megválaszolására nincs lehetőségünk. Ezen bizonytalanság kiküszöbölésére részletesen elemezni és szükség szerint módosítani szükséges a szoftver által alkalmazott pontértékeket.

Az izolált Prevotella-fajok száma kicsi volt

Az eredményeink alapján szembe tűnő, hogy az izolált *Prevotella* fajok száma rendkívül kicsi. Ennek az oka az, hogy a prevotellákkal kapcsolatos telepmorfológiai ismereteink hiányosak. Ezek a baktériumok jellegtelen, kisméretű telepeket képeznek, továbbá rendkívül érzékenyek a környezeti tényezők változására. További munkánk során külön táptalajt fogunk alkalmazni ezeknek a baktériumfajoknak az izolálására.

Mind az AMC, mind a pradofloxacin megfelelő választás a parodontitis kezelésében

A kapott MIC-értékek alapján megállapíthatjuk, hogy mind a pradofloxacin, mind pedig az amoxicillin-klavulánsav (AMC) megfelelő választás az előrehaladott parodontitis gyógyszeres kezelésében. Az amoxicillin-klavulánsavval szemben a pradofloxacin jobb választásnak tűnik az elhanyagolt, idült fogágygyulladás gyógyszeres kezelése esetén, ugyanis az ilyen típusú szöveteken keresztül kiváló a penetrációja. Az AMC áthatolóképessége a heveny gyulladással barriereken keresztül kifejezett. A klindamicin és a metronidazol esetén előfordultak ugyan rezisztens törzsek, azonban a mennyiségük az összes izolált törzshöz viszonyítva még nem jelentős, így ezek a szerek is alkalmazhatók a gyógyszeres kezelés során. Ezen kívül mindkét hatóanyag penetrációja kitűnő. A korábbi klinikai tapasztalataink azt mutatták, hogy ezekkel is kitűnő hatást lehet elérni. Jelenleg az egyetemi klinikán az amoxicillin-klavulánsav és spiramicin-metronidazol kombinációt alkalmazzuk ennek a betegségnek a gyógyszeres terápiájában. Az is előfordulhat, hogy az antibiotikum bizonyos esetekben „nem működik” a terápia során. Ennek azonban legtöbbször nem az antibiotikum-rezisztencia az oka, hanem valamilyen immunológiai probléma, vagy a nem megfelelően elvégzett fogászati beavatkozás, pl. a fogkövet hiányosan távolították el a subgingivális területekről. Elengedhetetlen a szakszerű szájhygiénás beavatkozás, ugyanis a gyógyszeres kezelés önmagában nem elegendő a betegség leküzdésére.

A kis arányú rezisztencia miatt a klindamicin és a spiramicin-metronidazol is alkalmazható

A metronidazol, a klindamicin és az AMC esetén az EUCAST-ban külön az anaerob baktériumokra meghatározott MIC-határértékeket alkalmazzuk, viszont a CLSI-ban a pradofloxacinra vonatkozó MIC-határértékeket az aerob és az anaerob baktériumokra egységesen állapították meg. Úgy gondoljuk, hogy helyesebb lenne az anaerobokra is differenciált határértékeket közölni. Korábban a pradofloxacin MIC-értékeinket egy másik negyedik generációs, emberi gyógyászatban használt fluorokinolon, a moxifloxacin CLSI által közölt anaerob baktériumokra vonatkozó MIC-határértékéhez ($S \leq 2 \text{ mg/l}$; $R > 8 \text{ mg/l}$) viszonyítottuk. A moxifloxacin és pradofloxacin MIC-határértékeit egyaránt figyelembe véve a törzseink mindkét fluorokinolon esetén az érzékeny tartományba esnek (11).

A pradofloxacin idült, elhanyagolt esetekben javasolt a kiváló megoszlás miatt

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondunk a Bayer Hungária Kereskedelmi és Szolgáltató Kft. a Németországban végzett laboratóriumi vizsgálatok anyagi háttérének biztosításáért.

IRODALOM

1. ALBUQUERQUE, C. – MORINHA, F. et al.: Canine periodontitis: The dog as an important model for periodontal studies. *Vet. J.*, 2012. 191. 299–305.
2. ALLAKER, R. P. – DE ROSAYRO, R. et al.: Prevalence of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in the dental plaque of dogs. *Vet. Rec.*, 1997. 140. 147–148.
3. ELLIOTT, D. R. – WILSON, M. et al.: Cultivable Oral Microbiota of Domestic Dogs. *J. Clin. Microbiol.*, 2005. 43. 5470–5476.
4. FOURNIER, D. – MOUTON, C. et al.: *Porphyromonas gulae* sp. nov., an anaerobic, Gram-negative coccobacillus from the gingival sulcus of various animal hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2001. 51. 1179–1189.
5. GÁL S. – LAJOS Z. – DUNAY M. P.: A fogágygyulladás kórfejlődése, kezelése és megelőzése kutyaiban. *Magy. Állatorvosok Lapja*, 2014. 136. 97–103.
6. GÁLFI P. – CSIKÓ Gy. – JERZSELE Á.: Állatorvosi Gyógyszertan III., Robbie-Vet Kft., Budapest, 2012. 305.
7. GLICKMAN, L. T. – GLICKMAN, N. W. et al.: Evaluation of the risk of endocarditis and other cardiovascular events on the basis of the severity of periodontal disease in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2009. 234. 486–494.
8. HAMADA, N. – TAKAHASHI, Y. et al.: Molecular and antigenic similarities of the fimbrial major components between *Porphyromonas gulae* and *P. gingivalis*. *Vet. Microbiol.*, 2008. 128. 108–117.
9. HARDHAM, J. – DREIER, K. et al.: Pigmented-anaerobic bacteria associated with canine periodontitis. *Vet. Microbiol.*, 2005. 106. 119–128.
10. HIRASAWA, M. – TAKADA, K.: *Porphyromonas gingivicanis* sp. nov. and *Porphyromonas crevioricanis* sp. nov., Isolated from Beagles. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1994. 44. 637–640.
11. http://shop.clsi.org/microbiology-documents/M02-M07-M100-PK_5.html, megtekintve: 2016. okt.10.
12. <http://shop.clsi.org/veterinary-medicine-documents/VET01-PK.html>, megtekintve: 2016. okt.10.
13. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_table.pdf, megtekintve: 2016. okt. 10.
14. <http://www.pro-lab.com/products-microbank.php?country=LV>, megtekintve: 2016. júl. 28.
15. ISOGAI, H. – KOSAKO, Y. et al.: Ecology of Genus *Porphyromonas* in Canine Periodontal Disease. *Zentralbl Veterinarmed. B.*, 1999. 46. 467–473.
16. JEUNETTE, I. C. – ROMÁN, A. M. et al.: 24-hour evaluation of dental plaque bacteria and halitosis after consumption of a single placebo or dental treat by dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 2016. 77. 613–619.
17. JOUSIMIES-SOMER, H. R. – SUMMANEN, P. et al.: *Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual*. 6th ed., Belmont, California, Star Publishing Company, 2002. 64.
18. KARDOS G.: *Hogyan segíti a MALDI-TOF MS az aerob baktériumok gyors species identifikálását*. https://doki.net/tarsasag/infektologia/upload/infektologia/document/mifkmt2013_kardos_gabor_malдитof.pdf, megtekintve: 2016. júl. 28.
19. KATO, Y. – SHIRAI, M. et al.: Molecular Detection of Human Periodontal Pathogens in Oral Swab Specimens from Dogs in Japan. *J. Vet. Dent.*, 2011. 48. 84–89.
20. LOVE, D. N. – KARJALAINEN, J. et al.: *Porphyromonas canoris* sp. nov., an Assacharolytic, Black-Pigmented Species from the Gingival Sulcus of Dogs. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1994. 44. 204–208.
21. LOVE, D. N.: *Porphyromonas macacae* comb. nov., a Consequence of *Bacteroides macacae* Being a Senior Synonym of *Porphyromonas salivosa*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1995. 45. 90–92.
22. NORDHOFF, M. – RÜHE, B. et al.: Association of *Treponema* spp. with canine periodontitis. *Vet. Microbiol.*, 2008. 127. 334–342.
23. SENHORINHO, G. N. A. – NAKANO, V. et al.: Detection of *Porphyromonas gulae* from subgingival biofilms of dogs with and without periodontitis. *Anaerobe*, 2011. 17. 257–258.
24. TÖZSÉR J. – EMRI T. – CSŐSZ É.: *Fehérjebiotechnológia*, Debrecen, 2011. 44–46. URL: http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Proteinbiotech_hu_book/ch04.html, megtekintve: 2016. júl. 28.
25. WALLIS, C. – MARSHALL, M. et al.: A longitudinal assessment of changes in bacterial community composition associated with the development of periodontal disease in dogs. *Vet. Microbiol.*, 2015. 181. 271–282.
26. YAMASAKI, Y. – NOMURA, R. et al.: Distribution of periodontopathic bacterial species in dogs and their owners. *Arch. Oral Biol.*, 2012. 57. 1183–1188.

Közlésre érk.: 2018. márc. 8.