

The effects of biofilm production on the antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from dogs

Jerzsele Ákos*
Albrecht Vivien
Gálfi Péter
Gyetvai Béla

Á. Jerzsele*
V. Albrecht
P. Gálfi
B. Gyetvai

SZIE ÁOTK
Gyógyszertani és
Méregtani Tanszék
H-1078 Budapest
István utca 2.

*e-mail:
jerzsele.akos@aoatk.szie.hu

A biofilmképzés hatása antibiotikumokkal szembeni *in vitro* érzékenységre kutyából izolált *Pseudomonas aeruginosa* törzseknél

ÖSSZEFOGLALÁS A szerzők tanulmányukban összehasonlították a *Pseudomonas aeruginosa* törzsek biofilmjeinek, ill. planktonikus formáinak érzékenységét gentamicinre, kolisztinre és marbofloxacinra. Meghatározták a planktonikus baktériumtörzsek érzékenységét marbofloxacinra, a marbofloxacin-gentamicin és a marbofloxacin-kolisztin kombinációkra. Az érzékenységet a MIC- (minimális gátlókoncentráció) értékek leolvasásával állapították meg, kutatásukat a CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) irányelvei alapján végezték. Második lépésben a törzseket Müller-Hinton-levesben 8 órán keresztül, antibiotikum jelenléte nélkül inkubálták, amelynek következtében a baktériumok biofilmet képeztek. A biofilmben található *P. aeruginosa* baktériumtörzsek érzékenységét vitális festéssel (MTS-formazán) vizsgálták fotometriás meghatározással. A planktonikus *P. aeruginosa* törzsek 91,7%-a volt érzékeny marbofloxacinra, míg a marbofloxacin gentamicinnel, ill. kolisztinnel alkotott 1 : 1 arányú kombinációjára az összes baktériumtörzs érzékeny volt. Az antibiotikumok 1 : 1 arányú elegyként való alkalmazásakor a MIC-értékek kisebbek voltak, mint a marbofloxacin önálló használatakor. A biofilmet képző törzsek esetében az EC₅₀- (hatékony koncentráció) értékeket vizsgálták. Az eredmények alapján elmondható, hogy a biofilmképzés jelentős mértékben csökkentette a vizsgált *P. aeruginosa* törzsek érzékenységét bizonyos antibakteriális szerekre. A kísérletünkben használt hatóanyagok kombinációban történő használata hatásosabb volt az önálló alkalmazáshoz képest.

SUMMARY The aim of this study was to evaluate the *in vitro* activity of marbofloxacin, gentamicin, colistin and their combinations. The authors compared the sensitivity of planktonic cells with bacteria in biofilms. The susceptibility of the planktonic cells was determined to marbofloxacin, marbofloxacin-gentamicin and marbofloxacin-colistin combination with the microdilution method by determining MIC values according to CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) guidelines. In the second part of the study the bacterial strains were incubated without antimicrobials in microplate wells for 12 hours to form biofilms. To determine the sensitivity of biofilm-grown cells a photometric method utilizing MTS-formazan formation was performed. Among the examined planktonic *P. aeruginosa* strains, 91.7% was sensitive to marbofloxacin and all of the strains were susceptible to the 1 : 1 combination of the antimicrobials. In case of marbofloxacin, MICs ranged from 0.25 to 4 µg/ml, in case of the marbofloxacin-gentamicin and marbofloxacin-colistin combinations these were between 0.0625 and 1 µg/ml. The MIC₅₀ and MIC₉₀ values of marbofloxacin were 1 µg/ml and 2 µg/ml, respectively. These values for the marbofloxacin:gentamicin combination were 0.5 µg/ml and 1 µg/ml, respectively, while for the marbofloxacin:colistin combination 0.0625 µg/ml and 0.5 µg/ml, respectively. To examine the susceptibility of biofilm-grown strains EC₅₀ (effective concentration 50%) was used. Concerning marbofloxacin these values ranged from 64 to 4096 µg/ml. In case of marbofloxacin-gentamicin combination the EC₅₀ was found between 8–2048 µg/ml, while the 1 : 1 combination of marbofloxacin-colistin showed EC₅₀ values between 8–128 µg/ml. Based on the results, the susceptibility of the examined strains was significantly decreased in biofilms compared to planktonic cells, and the antimicrobial combinations increased the sensitivity of these strains.

A *Pseudomonas aeruginosa* által okozott kórképek igen gyakoriak és komoly gondokat okoznak a társállatgyógyászatban. Ilyen betegségek például a külső hallójárat-gyulladás és a gennyes bőrgyulladás, valamint ritkábban a húgyúti és légúti fertőzések. A bántalmak kezelése napjainkban egyre nehezebb. Az említett kórképek ugyanis gyakran hosszú távú baktériumellenes kezelést követelnek, amely során rövidebb-hosszabb időn belül csökken az alkalmazott antibiotikum iránti érzékenység, és nagy eséllyel alakul ki rezisztencia a kórokozókban. A *P. aeruginosa* baktériumtörzsre gyakran jellemző a multirezisztencia, ill. a humán gyakorlatban kimutattak ún. pánrezisztens törzseket is, amelyek minden eddig ismert antibiotikummal szemben ellenállóak (11).

A *P. aeruginosa* képes arra, hogy biofilmet képezzen. Ebben az esetben a mikrobák jelentős változásokon mennek keresztül, így a planktonikus (a tápközegben szabadon úszó, biofilmet nem képző mikroorganizmusok) formától morfológiailag és élettanilag is különböznek (6). A biofilmképzés kulcsfontosságú lépése a szénhidrátszintézis, amelyben a *pel* gén funkciója kiemelkedő. A *sadB* gén kifejeződése szintén fontos szerepet tölt be a biofilmképzés reverzibilis és irreverzibilis fázisa közötti átmenetben. A *quorum sensing* (a baktériumok lokális sűrűségérzékelése) rendszerben dokumentáltak még két olyan gént (*lasB*, *rhlA*), amelyek bizonyítottan hozzájárulnak a baktériumok biofilmképzéséhez (8).

A külső hallójárat-gyulladásokból izolált *P. aeruginosa* törzsek jelentős része képez ún. biofilmet

A *P. aeruginosa* gyakran okoz súlyos, terápiarezisztens fertőzést a kisállatgyógyászatban

Egy 2013-ban közölt kutatás során az előbb említett gének jelenlétét vizsgálták külső hallójárat-gyulladásban szenvedő kutyákból izolált 83 *P. aeruginosa* törzs esetében. Az összes izolátumban megtalálható volt a *lasB* és *sadB* gén, míg *pelA* és *rhlA* génje csak 72-nek volt. A tanulmányban vizsgált 83 törzs 40%-a képezett biofilmet és mindegyikük tartalmazta a négyféle gént. Ezek alapján megállapították, hogy a törzsek genetikai tulajdonságai kulcsfontosságú szerepet játszanak a biofilmképzésben (10). A PA14 *P. aeruginosa* mutáns elemzése során hét szomszédos gént azonosítottak, a *pel* géneket, amelyek bizonyítottan fontos szerepet játszanak a „*pellicle*” extracelluláris mátrix képzésben. A *pellicle* a *P. aeruginosa* által képezett biofilmforma, amely a levegő-folyadék határfelületen alakul ki (7). A biofilmet képező baktériumok a planktonikus formánál jóval ellenállóbbak mind az immunrendszerrel, mind az antibakteriális szerekkel szemben. A legtöbb antibiotikum iránti érzékenység 50–2000-szeresével is csökkenhet (1).

Az előbbieken felvetett jelenségeket többek között a megfelelő koncentrációjú és kombinációjú antibiotikumok alkalmazásával csökkenthetjük. A *P. aeruginosa* által kiváltott fertőzések esetén leggyakrabban használatos hatóanyagok az állatgyógyászatban az aminoglikozidok, a fluorokinolonok, a polimixinek, továbbá a *Pseudomonas*-ellenes β -laktámok (8). BRIEDIS és ROBSON (3) 63 *P. aeruginosa* törzs aminoglikozid antibiotikumok iránti érzékenységét tanulmányozta. A vizsgált hatóanyagok növekvő hatékonyság szerint a következők voltak: netilmicin, amikacin, gentamicin, tobramicin. MÜLLER és HORN (9) 7118, kutyából és macskából izolált különböző baktériumfaj érzékenységi vizsgálatát végezte el enrofloxacinra és marbofloxacinra. Kutyák esetében 288 *P. aeruginosa* törzset mutattak ki, amelyek érzékenyebbek voltak marbofloxacinra, mint enrofloxacinra. A mikrobák 60%-a volt érzékeny, 15%-a mérsékelten érzékeny, 25%-a rezisztens marbofloxacinra. TIMURKAYNAK és mtsai (12) számos, nem hagyományos antibakteriális szer hatékonyságát vizsgálta multirezisztens *P. aeruginosa* törzsek ellen: a kolisztinre megállapított érzékenységi arány 89% volt. PYE (8) egy 2013-ban készült felmérés során kutyák füléből izolált biofilmképző *P. aeruginosa* törzsek MIC-értékeit határozta meg bizonyos antibiotikumokra, és összehasonlította a planktonikus forma MIC-értékeivel. A biofilmbe ágyazott baktériumok rezisztenciája szignifikánsan nagyobb volt a planktonikus formánál az összes vizsgált antibakteriális szerrel szemben.

A biofilmbe ágyazott baktériumok ellenállóbbak az immunrendszerrel és az antibiotikumokkal szemben

ANYAG ÉS MÓDSZER

A hazai külső hallójárat-gyulladásokból izolált *P. aeruginosa* törzsek biofilmképző tulajdonságát vizsgálták

Kísérletünkben a 24 vizsgált *P. aeruginosa* baktériumtörzs a Duo-Bakt mikrobiológiai laboratóriumából (Budapest), a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Karának Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékéről, valamint a Gyógyszertani és Méregtani Tanszékéről származik. A felhasznált törzseket Magyarországon izolálták külső hallójárat-gyulladás klinikai tüneteit mutató kutyákból. Első lépésként két módszer segítségével is alátámasztottuk a baktériumtörzsek biofilmképző tulajdonságát. Pásztázó (scanning) elektronmikroszkóppal (Zeiss EvoMA10) készült felvételek által morfológiai szempontból figyeltük meg az izolátumok biofilmképzését. Egy molekuláris biológiai technológiát, a kvalitatív polimeráz-lánreakciót (PCR) alkalmazva pedig génszinten (*pelA*, *pelB*, *pelE*) elemeztük a törzsek biofilmképző adottságát. Kutatásunk fő célja az volt, hogy felmérjük a planktonikus baktériumtörzsek elleni minimális gátlókoncentráció- (MIC, MIC₅₀, MIC₉₀) értékeket marbofloxacin, marbofloxacin-gentamicin és marbofloxacin-kolisztin kombinációk esetében. Vizsgáltuk továbbá a biofilmképző *P. aeruginosa* baktériumtörzsek érzékenységét vitális festéssel (MTS-formazán), fotometriás meghatározással.

A *P. AERUGINOSA* BAKTÉRIUMTÖRZSEK BIOFILMKÉPZŐ TULAJDONSÁGAINAK MEGHATÁROZÁSA

Scanning elektronmikroszkópos vizsgálat

Az alkohollal fixált mintákat ZEISS EVO MA10 scanning elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

A *pelA*, *pelC* és *pelE* gének kimutatására PCR-vizsgálattal

A bakteriális DNS-t 12 órás *P. aeruginosa* baktériumtenyészetből vontuk ki az E.Z.N.A. bacterial DNA-kit (OMEGA Bio-Tek, Norcross, USA) segítségével, a centrifugáláson alapuló eljárást alkalmazva, a gyártó utasításainak megfelelően. A kivont DNS koncentrációját a NanoDrop ND-1000 spektrofotométer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) segítségével határoztuk meg. A PCR-t (polimeráz-lánreakciót) MiniOpticon PCR-készülékkel (BioRad, Hercules, CA, USA) végeztük, amelyhez az 5PRIME HotMasterMix-et (5PRIME GmbH, Hamburg, Germany) használtuk, a gyártó előírásai szerint. A reakció során használt primerek az [1. táblázatban](#) szerepelnek. A reakció hőprofilja a következő volt: 2 perc 95 °C-on, majd 30 ciklus; 20 másodperc 95 °C-on, 20 másodperc 54 °C-on és 1 perc 65 °C-on. A PCR-terméket agarózgélben megfuttattuk, melyhez 2%-os agarózgél használtunk. 1 µl töltőpuffert 5 µl PCR-termékkel összekeverve az agarózgél zsebeibe töltöttük. A gélbe, a minták melletti zsebbe 2 µl molekulatömeg-markert (O'GeneRuler Low Range DNA Ladder,

Scanning elektronmikroszkóppal és PCR-vizsgálatokkal jellemezték a törzsek biofilmképzését

1. TÁBLÁZAT. A *pelA*, *pelC* és *pelE* gének meghatározásához használt primerek

TABLE 1. Primers for the determination of *pelA*, *pelC* and *pelE* genes

Gén	NCBI azonosító szám	Primer szekvenciák	PCR-termék mérete (bp)
<i>pelA</i>	YP_790107.1	F 5'-CAGCAAGAAAGGAATCGCCG-3' R 5'-GACCGACAGATAGGCGAAGG-3'	289
<i>pelC</i>	YP_790109.1	F 5'-GCCGCTGCTCAATTATCC-3' R 5'-TCGAGGCCGTTCTGTACTG-3'	240
<i>pelE</i>	YP_790111.1	F 5'-TGGTACTGGGAAGTGGCCTA-3' R 5'-ACTATCGATTCCCGCCTCT-3'	210

Mikrohígítási
módszerrel vizsgálták
a törzsek
antibiotikum-
érzékenységét
gentamicin, kolisztin,
marbofloxacin, ill. ezek
egyes kombinációi
esetében

A biofilmek
vizsgálatakor
spektrofotometriás
módszerrel határozták
meg az EC_{50} -értékeket

Az ELMI és a PCR-
vizsgálatok
bizonyították a törzsek
biofilmképzését

Fermentas) töltöttünk. Az elektroforézist 80 V feszültségen végeztük, 25 percig, 1× TBE (TRIS/borát/EDTA) futtató pufferben. A kialakult sávokat az InGenius LHR Gel Documentation and Analysis System segítségével tettük láthatóvá.

A MIC-értékek meghatározása a planktonikus *P. aeruginosa* esetében

A MIC-értékek *in vitro* meghatározásához kettes alapú, mikrohígítási módszert (microbroth dilution) alkalmaztunk, amely megfelel a CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) M31-A3/2009 és M07-A8 irányelveinek (4, 5). A minimális gátlókoncentráció (MIC) az a legkisebb vizsgált antibiotikum-koncentráció, amelyben az adott kórokozó már nem képes szaporodni. A MIC_{50} az az antibiotikum-koncentráció, amely az adott kórokozó törzsek 50%-át gátolja a növekedésben, a MIC_{90} pedig a törzsek 90%-át. A kapott MIC-értékek alapján határoztuk meg az érzékeny, mérsékelt érzékeny és rezisztens törzsek arányát, melynek során a CLSI által megadott határértékeket, az ún. „breakpoint”-értékeket vettük alapul. A kísérletben vizsgált törzsek érzékenységének értékelésekor marbofloxacin esetében 1 µg/ml MIC-értéken vagy az alatt érzékenynek, 2 µg/ml MIC-érték esetén mérsékelt érzékenynek, 4 µg/ml-os minimális gátlókoncentrációnál, ill. felette rezisztensnek számít az adott baktériumtörzs. Gentamicin és kolisztin esetében ezek a MIC-határértékek a következőképpen alakulnak: legfeljebb 2 µg/ml esetén az adott baktérium érzékenynek minősül, 4 µg/ml esetén mérsékelt érzékeny, 8 µg/ml vagy afelett pedig rezisztens besorolást kap (CLSI M31-S1). A kombinációk értékelésénél a szigorúbb, marbofloxacinál ismertett értékeket vettük alapul.

A hatóanyagok EC_{50} -értékeinek meghatározása biofilmképzéskor

A biofilmek vizsgálatakor már nagyszámú baktérium van jelen, ezért gátlókoncentrációkat nem tudunk meghatározni. A nemzetközi szakirodalom ezekben az esetekben az ún. EC_{50} -értékeket írja le, amely egy adott törzs maximális növekedését (pozitív kontrollhoz viszonyítva) felére csökkentő hatóanyag-koncentráció. Az EC_{50} -értékek meghatározásához a tenyésztőedényeket 18 órás inkubáció után egy vitális festékkel, az ún. Celltiter 96 Aqueous One reagenssel (Promega Inc., Wisconsin, USA) kezeltük, amelyet a gyártó előírásainak megfelelően 1 órán át inkubáltunk. Amennyiben az adott antibiotikum-koncentrációnál jelen voltak élő baktériumok, a reagens metil-tetrazolium-tartalma átalakult vörösbarna színű formazánná, amelyet 490 nm-es hullámhosszon vizsgáltunk. A szín intenzitása egy bizonyos lineáris tartományban pozitív korrelációt mutat az életképes baktériumok számával. A növekedési intenzitásokat a pozitív kontrollhoz hasonlítottuk, amit a maximális extinkcióval (közegen áthaladó fény intenzitásának csökkenése) jellemeztünk. Amikor a maximális extinkció felét mértük, akkor kaptuk meg az ún. EC_{50} -értéket.

EREDMÉNYEK

P. aeruginosa törzsek biofilmképzése

A scanning elektronmikroszkópos vizsgálatok során kapott felvételek bizonyították a *P. aeruginosa* biofilmképző képességét. Az (1. ábra) mutatja a biofilmben ágyazott baktériumok közösségét.

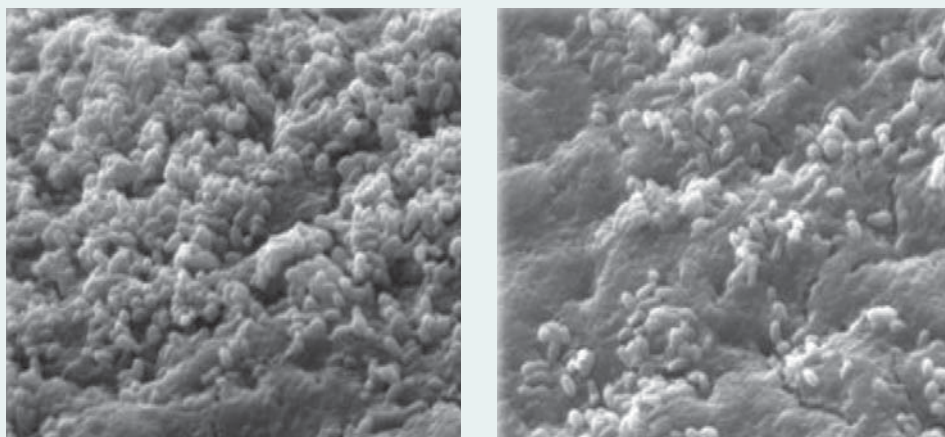
Az általunk vizsgált *P. aeruginosa* törzs genomjában PCR-módszerrel kimutattuk a három, általunk választott, a biofilmképzés háttérében álló gént (*pelA*, *pelC* és *pelE*).

A MIC-értékek meghatározása *P. aeruginosa* törzseknél

Marbofloxacin esetében a MIC-értékek 0,25 µg/ml-től 4 µg/ml-ig terjedtek. Az alkalmazott határértékek alapján tizenöt törzs (62,5%) volt érzékeny, hét törzs (29,2%) mérsékelt érzékeny, két törzs (8,3%) pedig rezisztens az alkalmazott fluorokinolonnal szemben. A MIC_{50} - és MIC_{90} -értékek 1 µg/ml, ill. 2 µg/ml voltak.

1. ÁBRA. Biofilmbe ágyazott *P. aeruginosa* baktériumok scanning elektromikroszkópos képe

FIGURE 1. *P. aeruginosa* rods embedded in biofilms



A marbofloxacin-gentamicin kombináció igen hatékony volt a planktonikus formájú *P. aeruginosa* ellen

A marbofloxacin-gentamicin 1 : 1 arányú kombinációjának vizsgálatakor jóval kisebb MIC-értékeket kaptunk, az értékek 0,0625 µg/ml és 1 µg/ml között változtak. A kombináció tehát igen hatékonynak bizonyult a kórokozó planktonikus formái ellen. A vizsgált törzsek mindegyike érzékeny volt a két szer kombinációjára, nem találtunk rezisztens izolátumot. A kombináció esetében a MIC₅₀- és MIC₉₀-értékek rendre 0,5 µg/ml, ill. 1 µg/ml voltak. A marbofloxacin-kolisztin 1 : 1 arányú kombinációjának alkalmazásakor szintén 0,0625 és 1 µg/ml között mozogtak a MIC-értékek. A határértékek alapján a vizsgált huszonnégy izolátum mindegyike kifejezetten érzékeny volt a kombinációra. A MIC₅₀ 0,0625 µg/ml, a MIC₉₀ 0,5 µg/ml volt. A különböző szerekekkel szembeni érzékenységi eredményeket a (2. táblázat) szemlélteti.

EC₅₀-értékek meghatározása a biofilmképző *P. aeruginosa* törzseknél

Marbofloxacin esetében széles intervallumban, 64 és 4096 µg/ml között változtak az EC₅₀-értékek. A marbofloxacin-gentamicin 1:1 arányú kombinációjának alkalmazásakor 8 µg/ml és 2048 µg/ml közé, a marbofloxacin-kolisztin 1:1 arányú elegyének vizsgálatakor jóval szűkebb intervallumban, 8 és 128 µg/ml között mozogtak az EC₅₀-értékek.

2. TÁBLÁZAT. A vizsgált *P. aeruginosa* törzsek érzékenységének százalékos megoszlása marbofloxacin, marbofloxacin-gentamicin és marbofloxacin-kolisztin 1 : 1 arányú kombinációja esetében

TABLE 2. Percentage distribution of *P. aeruginosa* strains resistant, moderately sensitive and sensitive to marbofloxacin, marbofloxacin-gentamicin and marbofloxacin-colistin 1 : 1 combinations

	Marbofloxacin	Marbofloxacin-gentamicin	Marbofloxacin-kolisztin
Érzékeny (%)	62,5	100	100
Mérsékelten érzékeny (%)	29,2	0	0
Rezisztens (%)	8,3	0	0

A biofilmeknél kapott EC₅₀-értékek kivétel nélkül szignifikánsan nagyobbak voltak, mint az ugyanezeknél a törzseknél tapasztalt planktonikus MIC-értékek ($p < 0,05$).

A 4. táblázatban látható a vizsgált *P. aeruginosa* baktériumtörzsekre jellemző érzékenységcsökkenés.

MEGVITATÁS

Megállapították, hogy a 24 vizsgált törzs biofilmképző tulajdonságú

Kísérletünkben megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált 24 *P. aeruginosa* törzs rendelkezik biofilmképző tulajdonsággal, aminek következtében az izolátumok antibiotikum-érzékenysége jelentősen csökkent, ami megfelel az irodalomban leírtaknak (2). PCR-módszerrel kimutattuk a *pelA*, *pelC*, *pelE* géneket, amelyek,

3. TÁBLÁZAT. A biofilmképző *P. aeruginosa* törzsek MIC- és EC₅₀-értékei (µg/ml) marbofloxacín, marbofloxacín-gentamicin és marbofloxacín-kolisztin kombinációk esetében

TABLE 3. MIC and EC₅₀ values (µg/ml) of planktonic and biofilm producing strains of *P. aeruginosa* in case of marbofloxacín, marbofloxacín-gentamicin and marbofloxacín-colistin

Törzs száma	Marbofloxacín		Marbofloxacín-gentamicin		Marbofloxacín-kolisztin	
	MIC (µg/ml)	EC ₅₀ (µg/ml)	MIC (µg/ml)	EC ₅₀ (µg/ml)	MIC (µg/ml)	EC ₅₀ (µg/ml)
18	0,5	64	0,5	16	0,125	64
20	1	2048	0,5	64	0,5	128
21	2	2048	0,5	64	0,5	64
22	2	4096	0,5	64	0,5	128
24	1	2048	1	8	0,5	64
25	2	2048	1	64	1	64
26	1	4096	1	16	0,5	128
28	0,5	2048	0,5	64	0,25	128
29	4	512	0,25	128	0,0625	8
30	4	4096	0,25	8	0,0625	8
31	2	4096	0,25	64	0,0625	128
32	2	2048	0,5	6	0,25	32
33	1	1024	0,5	512	0,5	64
34	1	4096	1	8	0,5	64
35	2	4096	1	64	0,5	8
37	0,25	2048	0,5	8	0,0625	8
38	0,5	512	0,5	64	0,0625	16
39	2	2048	0,5	2048	0,5	16
44	0,5	1024	0,5	8	0,0625	16
47	0,25	1024	0,5	8	0,0625	16
48	0,25	1024	0,25	64	0,0625	8
49	0,25	1024	0,0625	128	0,0625	32
51	1	2048	0,25	128	0,25	32
52	0,25	1024	0,25	128	0,0625	128
Átlag ± SD	1,3 ± 1,1	2093,3 ± 1319,8	0,52 ± 0,28	155,6 ± 415,9	0,29 ± 0,26	56,3 ± 47,2

4. TÁBLÁZAT. A biofilmet képző *P. aeruginosa* törzsek planktonikus formáihoz viszonyított érzékenységcsökkenés mértéke

TABLE 4. Rate of decrease in sensitivity when comparing biofilms to planktonic forms in *P. aeruginosa*

A biofilmképző formák érzékenységének csökkenése (n-szeres) a planktonikus formákhoz képest (n = 24)										
8×	16×	32×	64×	128×	256×	512×	1024×	2048×	4096×	8192×
Marbofloxacin esetében a törzsek száma (db)										
0	0	0	0	2	0	0	7	7	7	1
Marbofloxacin-gentamicin kombináció esetében a törzsek száma (db)										
2	5	2	2	5	2	3	1	1	1	0
Marbofloxacin-kolisztin kombináció esetében a törzsek száma (db)										
0	0	1	0	12	6	2	0	2	0	0

szakirodalmi adatok (7) szerint, a biofilmképzés háttérében állnak. Pásztázó elektronmikroszkóppal készült felvételeink igazolták, hogy biofilmképzéskor a mikrobák jelentős morfológiai változáson mennek keresztül (6).

Az eredményekből jól kitűnik, hogy a *P. aeruginosa* általunk vizsgált planktonikus formái általában érzékenyek marbofloxacinra, marbofloxacin-gentamicin és marbofloxacin-kolisztin 1 : 1 arányú kombinációira egyaránt. Az irodalmi adatoknak megfelelően (8) az általunk vizsgált hatóanyagok alkalmasak *P. aeruginosa* okozta fertőzések kezelésére.

Egy humán vizsgálat (10) eredményei megegyeztek az általunk megállapítottakkal, miszerint a biofilmben ágyazott baktériumok érzékenysége szignifikánsan kisebb az összes vizsgált antibakteriális szerrel szemben a planktonikus formánál. Megjegyezzük azonban, hogy a kutatásunkban, a biofilmet képző forma esetében, az EC₅₀-értékeket vizsgáltuk, míg a külföldi felmérésben a planktonikus formához hasonlóan a MIC-értékeket vették alapul.

A kapott érzékenységcsökkenés az általunk vizsgált izolátumok esetében 10, 8000×-es, ezáltal tapasztalataink hasonlóak voltak a külföldi vizsgálatokhoz, miszerint a legtöbb antibiotikummal szembeni érzékenység 50, 2000×-esével csökkenhet (1).

Eredményeink birtokában kijelenthetjük, hogy a 8 órán át tartó inkubáció eredményeképpen kialakult biofilmben a baktériumtörzsek érzékenysége jelentősen csökkent a vizsgált hatóanyagokra és kombinációikra. A kapott EC₅₀-értékek nagyságrendekkel nagyobbak voltak, mint az ugyanezeknél a törzseknél tapasztalt planktonikus MIC-értékek. Kijelenthető továbbá, hogy a marbofloxacin-kombinációk esetében kapott EC₅₀-értékek szignifikánsan kisebbek voltak, mint az önálló fluorokinolonra kapott értékek. A marbofloxacin-gentamicin és a marbofloxacin-kolisztin kombinációk EC₅₀ értékei között nem volt jelentős különbség.

Jelen vizsgálat során megállapítást nyert, hogy a planktonikus és a biofilmképző *P. aeruginosa* okozta külső hallójárat-gyulladás kezelésére az 1 : 1 arányú fluorokinolon-kombinációk használata a legkedvezőbb. A vizsgálat alapján elmondható, hogy indokolt a biofilmképző *P. aeruginosa* törzsek jelenlétekor a hatóanyagokat nagyobb koncentrációban alkalmazni.

A biofilmképződés jelentősen csökkentette a vizsgált törzsek antibiotikum-érzékenységét

A marbofloxacin-kombinációk szignifikánsan hatékonyabbak az önállóan adott fluorokinolonnál

IRODALOM

1. BANIN, E. – BRADY, K. M. et al.: Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006. 72. 2064–2069.
2. BOYEN, F. – EEECKHAUT, V. et al.: Quorum sensing in veterinary pathogens: Mechanisms, clinical importance and future perspectives. *Vet. Microbiol.*, 2009. 135. 187–195.
3. BRIEDIS, J. D. – ROBSON, H. G.: Comparative activity of netilmicin, gentamicin, amikacin, and tobramycin against *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1976. 10. 592–597.
4. CLSI-guideline M07-A8 2009 – Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.
5. CLSI-guideline M31-S1 2009 – Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Informational Supplement.
6. DAVIES, D. G. – PARSEK, M. R. et al.: The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 1998. 280. 295–298.
7. FRIEDMAN, L. – KOLTER, R.: Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol. Microbiol.*, 2004. 51. 675–690.
8. GÁLFI P. – CSIKÓ Gy. – JERZSELE Á.: *Állatorvosi gyógyszerteran III.* Budapest: Robbie-Vet Kft. 2012. 81–83, 206–208, 134–138.
9. MÜLLER E. – HORN, S.: Efficacy of enrofloxacin and marbofloxacin against bacterial isolates from dogs and cats. In vitro resistance study. *Prakt. Tierarzt*, 2009. 90. 512–521.
10. PVE, C.: *Pseudomonas aeruginosa bacterial biofilms.* Doctoral Thesis. University of Guelph, Ontario, Canada. 2013.
11. SOULI, M. – GALANIL. I. et al.: Emergence of extensively drug-resistant and Pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Eurosurveillance*, 2008. 13. 19045–19056.
12. TIMURKAYNAK, F. – FUSUN, C. et al.: In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2006. 27. 224–228.

Közlésre érk.: 2014. okt. 15.