

# ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék



## Aktív HOCl tartalmú fertőtlenítő antimikrobiális és biofilmellenes hatása

Készítette:

**Bencsik Luca**

V. évfolyam, állatorvos szak

Témavezetők:

Dr. Kerek Ádám

ÁTE, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, PhD-hallgató

Dr. Veres Adrienn Mercédesz

ÁTE, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, egyetemi tanársegéd

**Budapest**

**2021**

## TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
1 Bevezetés.....	4
2 Irodalmi áttekintés.....	5
2.1 A fertőtlenítőszeresek használatának jelentősége.....	5
2.2 Fertőtlenítőszeresek.....	5
2.3 A hipoklórossav tulajdonságai, előállítása és felhasználása.....	9
2.3.1 Az aktív HOCl hatásmechanizmusa, mikróballenes hatása.....	10
2.3.2 A HOCl stabilitása, alkalmazása.....	12
2.4 Az egyes baktériumok és gombák járványtani jelentősége.....	13
2.5 A biofilmek jelentősége az állatorvoslásban.....	16
3 Célkitűzések.....	18
4 Anyag és módszer.....	19
4.1 A HOCl fertőtlenítőszer.....	19
4.2 A vizsgált baktérium- és gombatorzsek.....	19
4.3 Kiindulási CFU meghatározása.....	20
4.4 MIC érték meghatározása.....	21
4.5 Az MBC és MFC értékek meghatározása.....	24
4.6 Az ölési görbék meghatározása.....	25
4.7 A biofilmellenes hatás vizsgálata.....	25
5 Eredmények.....	28
5.1 Kiindulási CFU értékek.....	28
5.2 A tapasztalt MIC értékek.....	28
5.3 Az MBC és MFC meghatározás eredményei.....	29
5.4 Ölési görbe meghatározás eredményei.....	29
5.5 Biofilmellenes hatás vizsgálatának eredménye.....	32
6 Következtetések.....	33
7 Összefoglaló.....	35
8 Summary.....	36
9 Irodalomjegyzék.....	37
10 Köszönetnyilvánítás.....	41

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATP	Adenozin-trifoszfát
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CFU	Telepformáló egység ( <i>Colony-forming Unit</i> )
CHO	Szénhidrát
ClO <sup>-</sup>	Hipoklorit-ion
DNS	Dezoxiribonukleinsav
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemorragiás <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropatogén <i>Escherichia coli</i>
EPS	Extracelluláris polimer anyag ( <i>Extracellular Polymeric Substance</i> )
ETEC	Enterotoxikus <i>Escherichia coli</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrogén-peroxid
HOCl	Hipoklórossav
MBC	Minimális baktericid koncentráció ( <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> )
MFC	Minimális fungicid koncentráció ( <i>Minimum Fungicidal Concentration</i> )
MH	Müller-Hinton
MIC	Minimális gátló koncentráció ( <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> )
MRSA	meticillin-rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i>
MTS	Metiltetrazólium só
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát
NaOCl	Nátrium-hipoklorit
NH <sub>2</sub>	Amino csoport
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
TSA	Tripton-szója agar ( <i>Trypticase soy agar</i> )
TSB	Tripton-szója leves ( <i>Trypticase soy broth</i> )

## 1 BEVEZETÉS

A XXI. században az antimikrobiális rezisztencia jelensége a modern társadalmak egyik legjelentősebb problémája. Megfékezése, illetve a terjedés mértékének visszaszorítása az állat- és népegészségügy közös érdeke. Ebből kifolyólag mind humán, mind állatorvosi vonalon törekedni kell az antibiotikum-felhasználás csökkentésére, melynek legkézenfekvőbb módszere a bakteriális megbetegedések kialakulásának megelőzése. A hatékony prevenció kulcsfontosságú eleme a környezeti kórokozók számának visszaszorítása a megfelelő higiénia biztosítása révén, melynek kivitelezésében nélkülözhetetlen szerepet töltenek be a hatékonyan alkalmazható fertőtlenítőszeresek. Egy gazdaságon belül az állatok egészséges környezetének biztosítása érdekében elengedhetetlen egy megfelelő fertőtlenítési protokoll kidolgozása, amely amellet, hogy a kórokozók környezeti elszaporodásának csökkentése által hozzájárul a kisebb mértékű antibiotikum-felhasználáshoz, elősegíti a haszonállattartó telepek gazdaságosabb működését a csökkent gyógyszerköltségek mellett megnövekedett produktivitás révén.

Kihívást jelent azonban olyan fertőtlenítő hatású készítményt előállítani, amely amellet, hogy költséghatékony, megfelelő és tartós védelmet is biztosít a kórokozókkal szemben, miközben nem károsítja a természetet és nem mérgező az élőlényekre nézve sem. Ezeknek az elvárásoknak megfelelő, környezetbarát alternatíva lehet a hipoklórossav (HOCl), amely széles hatásspektrumának köszönhetően kiemelkedő hatékonysággal és csíraölőképességgel bír, ráadásul egy esetlegesen fellépő fertőzés során, az immunrendszer kórokozókkal szembeni védekezőmechanizmusa részeként, természetes módon a szervezetben is keletkezik, így ártalmatlan a gazdaszervezetre nézve.

## 2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 A fertőtlenítőszeres használatának jelentősége

A fertőtlenítés egy rendkívül fontos profilaktikus intézkedés az állattenyésztésben, segítségével ugyanis elkerülhető az antimikrobiális adalékanyagok takarmányban történő alkalmazása, valamint csökkenthető az élelmiszertermelő haszonállatoknak a terápiás cézzattal adott gyógyszerek mennyisége. A tisztítás és fertőtlenítés az optimális állattartással és takarmányozással, valamint a professzionális állománymenedzsmenttel együtt hozzájárulnak a telepen található állatok egészségéhez és jóllétéhez [1], melynek következtében a termelékenység és takarmányhasznosítás is optimalizálható [2]. Jelentősége van továbbá a gazdaságban található immunhiányos állatok, például az újszülött, kifejlett immunrendszerrel még nem rendelkező egyedek, vagy a vemhes, frissen ellett, szoptató állatok fertőzési nyomásának csökkentésében, ugyanis ők állapotuknál fogva fogékonyabbak a betegségekre [3].

A gazdaságon belüli biológiai védelem olyan intézkedések összesége, melyek az állatokat érintő betegségek távoltartását, valamint azok terjedésének korlátozását teszik lehetővé [4]. Az állattartó telepeken alkalmazott állategészségügyi és biológiai védőintézkedések közé tartozik a rendszeres állatorvosi vizsgálat, a beteg egyedek egészséges társaiktól való elkülönítése (izoláció), az állományba újonnan érkezett állatok karanténba helyezése, valamint az egészséges környezet biztosítása a megfelelő higiénia betartásával, amely magába foglalja az épületek és felszerelések rendszeres tisztítását és fertőtlenítését [3, 4]. Ezen megelőző, biztonsági intézkedések, valamint az állatjólét javítása hozzájárul a fertőzések megelőzéséhez, ezáltal az antimikrobiális szerek állatokon történő alkalmazásának, valamint a kórokozók velük szemben kialakult rezisztenciájának a csökkentéséhez, melynek következtében a gazdaságok állategészségügyi kiadásai is jelentősen mérséklődnének [5].

### 2.2 Fertőtlenítőszeres

Az ideális fertőtlenítőszer ismérve, hogy nem károsítja a környezetet és az élőlények egészségét, nem mérgező, nem irritatív, nem okoz allergiás tüneteket (aszma, bőrgyulladás), az érintett felületre nézve nem korrozív, nem tűzveszélyes, ugyanakkor rendkívül hatékony, széles antimikrobiális spektrummal, gyors, irreverzibilis és tartós hatással rendelkezik, melyet a környezeti tényezők, szerves szennyező anyagok (vér, bélsár, takarmány) nem befolyásolnak. Használata könnyű, szagtalan, vízben oldható, hígítva is

hatékony, kompatibilis a tisztítás során alkalmazott vegyszerekkel, szappanokkal, de maga is rendelkezik tisztító hatással, és mindez megfizethető áron elérhető a fogyasztók számára [6–8]. Ezeknek az elvárásoknak minden körülmények közt megfelelő fertőtlenítőszer nem létezik. Állatorvosként azonban törekednünk kell a gazdaság számára a lehető legjobb fertőtlenítőszer kiválasztására, figyelembe véve annak tulajdonságait, hatékonyságát [9], a tisztítandó felület anyagát, a jelenlévő mikroorganizmusokat, és a szükséges behatási időt [7]. Az állattartó létesítményekben a fertőtlenítés minden esetben magában foglalja az azt megelőző tisztítást is, ugyanis a telepi környezetben található nagy mennyiségű szerves szennyezőanyag (bélsár, takarmány, por) semlegesíti az alkalmazott fertőtlenítőszer hatását, ezért annak előzetes eltávolítása szükséges a fertőtlenítőszer használata előtt [1, 11, 12].

A kémiai fertőtlenítés során alkalmazott fertőtlenítő, illetve sterilizáló hatással rendelkező készítmények hatékonyan képesek elpusztítani a kórokozókat (baktérium, vírus, gomba, alga) vagy gátolni azok szaporodását. Ezek az anyagok tulajdonságaik alapján jól elkülöníthető csoportokba oszthatók. A **tisztító-fertőtlenítő hatású szerek** (*sanitizer*) nem minden kórokozót pusztítanak el, de közegészségügyi szempontól biztonságos szintre csökkentik a számukat. A **fertőtlenítőszer** élettelen tárgyakon alkalmazott anyagok, melyek elpusztítják vagy irreverzibilisen inaktíválják a legtöbb patogén mikroorganizmust, a spórákat azonban általában nem képesek megsemmisíteni. Az **antiszeptikumokat** élő szervezeteken alkalmazzák a kórokozók növekedésének gátlására, elpusztítására. A **sterilizálás** során fizikai (pl.: hő) vagy kémiai (pl.: etilén-oxid) módszerekkel semmisítik meg az élő mikrobák összes létformáját. A **detergens/tisztítószer** a felületeken található szennyeződések eltávolítását szolgálják, elősegítve ezzel a fertőtlenítőszer hatékony alkalmazását. Bizonyos fertőtlenítőszer, mint például a klórvegyületek, jodforok, kvaterner ammónium vegyületek tisztító tulajdonsággal is rendelkeznek [12].

A legfontosabb fertőtlenítőszer-csoportok közé tartoznak a **kvaterner ammónium vegyületek**, melyek olyan fertőtlenítő hatású anyagok, amelyek antimikrobiális hatásukat a mikroorganizmusok enzimjeinek blokkolása, valamint sejtmembránjaik integritásának megzavarása révén fejtik ki, előidézve ezzel a sejtalkotók sejtől történő kiáramlását és a baktériumsejt szétesését [13, 14]. Széles hatásspektrumának köszönhetően évek óta használják az állatgyógyászatban fertőtlenítésre, azonban a legújabb tanulmányok szerint a vízi toxicitást és antibiotikum rezisztenciát okozó képessége, valamint a szerves anyagok jelenlétében csökkenő hatékonysága miatt nem ajánlott alkalmazni [10]. Mindemellett az emberek és állatok egészségére, reprodukciójára is káros hatással lehet [15].

A **hidrogén-peroxid** ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) nem csupán baktericid, virucid, fungicid, de hatásosnak bizonyult a nagy ellenállóképességgel rendelkező bakteriumspórák, protozoa ciszták és prionokkal szemben is. Gáz és folyékony halmazállapotban egyaránt használják fertőtlenítésre és sterilizálásra [16]. Hatékonyságát nem csökkentik a szerves szennyező anyagok, gyorsan hat, nem károsítja a környezetet, azonban jelentősen drágább, mint a legtöbb fertőtlenítőszer, és alacsony koncentrációban nincs sporicid hatása [7, 17]. Hatásmechanizmusa nem teljesen ismert, azonban valószínűleg oxidációs aktivitásával van összefüggésben. A mikroorganizmusokat felépítő molekulák oxidációja ugyanis jelentős szerkezet- és funkciózavarhoz, a baktérium életképességének és fertőzőképességének elvesztéséhez vezet [16].

Az **alkoholok** baktericid, virucid, fungicid hatással rendelkező, nem korrozív anyagok, használatuk elsősorban környezeti fertőtlenítés során terjedt el, általában kis felületek, például gyógyszeres üvegek gumidugóinak a fertőtlenítésére szolgálnak, de mivel a szerves szennyező anyagok csökkentik a hatékonyságukat, továbbá gyorsan elpárolognak a felületről, nem ajánlott nagy felületeken alkalmazni, így állattartó telepek esetén nincs gyakorlati jelentőségük [7].

Bár a **jód** a klórhoz hasonlóan egy antiszeptikus hatással bíró erős oxidálószer, a vízben való rossz oldhatósága, gyenge kémiai stabilitása, magas helyi toxicitása, valamint a szerves anyagok jelenlétében történő inaktiválódása korlátozza széles körű alkalmazását [18, 19]. A jodoforok a jód oldószerekkel képzett komplex vegyületei [20]. Baktericid, virucid hatással rendelkeznek, gombaölő hatásuk eléréséhez azonban hosszú behatási időre van szükség. Főleg antiszeptikumként alkalmazzák, nem felületi fertőtlenítőszerként [7]. Kedvező tulajdonságai közé tartozik a fokozott oldhatóság, és a folyamatos jódfelszabadulás. Az egyik leggyakrabban alkalmazott jodofor a povidon-jód [12], melynek mikrobaölő hatását az elemi jód eredményezi, amely szabadon bejut a sejtbe, és valószínűleg az elektrontranszport, fehérjeszintézis, sejtlegzés gátlásán, a nukleinsavak denaturálásán, és a sejtmembrán károsításán keresztül fejt ki hatását [18].

Az **aldehidek** széles csíraölő spektrummal rendelkező fertőtlenítőszer, hatásukat a fehérjék denaturálásán és a nukleinsavak felbontásán keresztül fejtik ki. Nem korrozívak, azonban rendkívül irritatívak, helytelen használatuk veszélyt jelenthet az emberek és állatok egészségére. A glutáraldehidet elsősorban orvosi eszközök (pl.: endoszkópok), míg a

formaldehidet, valamint annak vizes oldatát, a formalint elektronikus és mechanikai berendezések felületének fertőtlenítésére használják [12].

A leggyakrabban alkalmazott klór alapú fertőtlenítőszer a **nátrium-hipoklorit** (NaOCl), melynek vizes oldata a hipó [21]. Ez egy megfizethető, erős oxidáló hatással rendelkező mikrobaölő szer, amely hatékonyan képes elpusztítani a káros mikroorganizmusokat, mindemellett biztonságos, könnyen kezelhető és kompatibilis a tisztítószerekkel, ezért széles körben alkalmazzák fertőtlenítésre, többek között az egészségügyi intézményekben, az élelmiszergyártással foglalkozó létesítményekben, háztartási környezetben és az ivóvízkezelés során. Másfelől rendkívül korrozív, nehezen hígítható, és a klinikai körülmények között gyakran előforduló testnedvekben (pl.: vérben, bélsárban) található mikroorganizmusok inaktiválásához általában magasabb koncentrációra (> 1000 ppm) van szükség belőle, ebben a koncentrációban a szerves vegyületekkel való érintkezés miatt karcinogén hatású trihalometánok és egyéb egészségre ártalmas mérgező anyagok keletkezhetnek, amelyek károsítják a száj-, a gyomor- és a légutak nyálkahártyáját, bőr- és szaruhártyairritációt, azok égési sérülését, továbbá emésztőrendszeri károsodást okozhatnak [21–26].

A NaOCl vizes oldata alkalikus ( $\text{pH} \geq 8$ ), benne a rendelkezésre álló szabad klór klórgáz, HOCl és hipoklorit-ion ( $\text{ClO}^-$ ) formájában van jelen. Ezek egymáshoz viszonyított arányát az oldat kémhatása határozza meg. Gyengén savas kémhatású oldatokban ( $\text{pH} 4-6$ ) a HOCl, ettől savasabb kémhatású oldatokban ( $\text{pH} < 4$ ) a klór, lúgosabb kémhatású oldatokban ( $\text{pH} 8,5-10$ ) pedig a  $\text{ClO}^-$  dominál [21]. A klór ezen formái közül a legnagyobb mikrobaölő és fertőtlenítő hatással a HOCl rendelkezik, melynek baktericid hatása nagyjából 80-szor nagyobb, mint a  $\text{ClO}^-$ -nak [27]. Ennek oka, hogy a  $\text{ClO}^-$  nehezebben jut át a baktérium sejtmembránjában, ezért az oxidáló hatását csak a sejtmembránon kívülről tudja kifejteni [23]. Egy tanulmányban NaOCl tartalmú fertőtlenítőszer hatékonyágát vizsgálták minimális gátló koncentráció (MIC) értékek meghatározásával, mely során azt találták, hogy  $\text{pH} 9$ -nél nagyobb kémhatású oldatot alkalmazva a MIC érték *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) esetén 945 mg/l, *Escherichia coli* (*E. coli*) esetén 1129 mg/l volt. Ezzel szemben az oldat  $\text{pH}$ -ját 7-re csökkentve a HOCl túlsúlya – ezáltal a mikrobaölő hatás növekedése – miatt mindkét baktérium esetén a MIC érték 150 mg/l-re csökkent [24]. A fertőtleníthetőség maximalizálása érdekében tehát a NaOCl vizes oldatához megfelelő mennyiségű savat kell adni, hogy a  $\text{pH}$  az enyhén savas tartományba tolódjon, és felgyorsuljon a disszociált  $\text{ClO}^-$  nem-disszociált HOCl-vá alakulása [23, 24, 28].



### 2.3 A hipoklórossav tulajdonságai, előállítása és felhasználása

A HOCl egy rendkívül erős oxidálószer, amely minden emlős szervezetében megtalálható, és a mikroorganizmusok széles spektruma ellen hatékony [6]. Gyengén savas és semleges közegben (pH 5-7) az egyik leghatékonyabb klórtartalmú vegyület, melynek szabad aktív klórtartalma akár 80% feletti értéket is elérhet, és sterilizáló hatása nagyjából nyolcvanszor nagyobb, mint a NaOCl-nak [29]. A HOCl egy természetes molekula, ugyanis fertőzés során az immunrendszer is termeli a szervezetben található kórokozók ellen [21]. A veleszületett immunválasz első védelmi vonalát képező fagociták, mint például a neutrofil granulociták fontos szerepet játszanak a szervezet bakteriális fertőzések elleni védekezésében, ugyanis bekebelezik a behatoló, idegen mikroorganizmusokat és elindítanak egy „légzési robbanás” (*oxidative burst*) folyamatot, amely során az aktivált neutrofilek membránjához kapcsolt enzim, a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát redukált formájának (NADPH) oxidáz enzime jelentős mennyiségű molekuláris oxigént alakít szuperoxiddá, amely szuperoxid-dizmutáz segítségével  $H_2O_2$ -ra bomlik [21, 30, 31]. A  $H_2O_2$  és kloridion reakciójának eredményeként a myeloperoxidáz enzim közvetítésével antimikrobiális hatással rendelkező HOCl keletkezik [32]. A neutrofil granulocitákban termelődött  $H_2O_2$  körülbelül 70%-a alakul át a myeloperoxidázok segítségével HOCl-vá [33]. Egyes becslések szerint 2 órás inkubációt követően  $10^6$  stimulált neutrofil granulocita 0,2  $\mu\text{mol}$  HOCl előállítására alkalmas, amely egy ezredmásodperc alatt képes 150 millió *E. coli* sejtet elpusztítani [34].

A HOCl oldat előállítása többféleképpen lehetséges [35]. Általában NaCl és víz elektrolízisével zajlik [36], azonban az ilyen módon előállított oldat csupán kis mennyiségű otthoni vagy kórházi felhasználásra megfelelő, használata korlátokba ütközik olyan területeken, ahol nagyobb mennyiségű fertőtlenítőszerre vagy magas szabad aktív klór koncentráció elérésére van szükség, mint például a mezőgazdaság, az állattenyésztés és az élelmiszeripar [29]. Emiatt napjainkban előtérbe kerültek újabb generációs, eltérő módszereken alapuló megoldások is, melyek során a HOCl gyártása elektrolízis nélkül zajlik. Az ásványi anyag hozzáadásával kezelt HOCl oldat (MS-HOCl) hasonló fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkezik, mint az elektrolízissel előállított HOCl oldat. Megfelelő, költséghatékony alternatívája a kórházi környezetben, élelmiszeriparban és baromfiiparban használt fertőtlenítőszernek, hiszen kiváló baktericid hatást mutat a *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *E. coli*, *Streptococcus mutans* és *Helicobacter pylori* ellen [35]. Egy másik elektrolízis nélkül előállított forma a hidrogén-ásványi alapú

HOCl (HM-HOCl), melyet a könnyű előállíthatóságának, kezelhetőségének, valamint magas mikrobaölő aktivitásának köszönhetően az utóbbi időben a mezőgazdaságban is elkezdtek alkalmazni. Segít megelőzni a halak vírusos megbetegedéseinek kialakulását, alkalmas a szarvasmarhatelepek szagmentesítésére, továbbá brojlercsirkék szignifikáns tömegnövekedését okozza, ha elegendően magas koncentrációban (50 ppm szabad aktív klór) van jelen az állatok ivóvizében [29].

A HOCl egy sokoldalú, világszerte széles körben alkalmazott fertőtlenítőszer, melyet széles hatásspektrumának, könnyű alkalmazhatóságának, költséghatékonyságának, környezetbarát tulajdonságának és biztonságosságának köszönhetően előszeretettel alkalmaznak a közegészségügyben, a mezőgazdaságban, az élelmiszeriparban, a halgazdaságokban, állatorvosi területeken, valamint ivóvizek fertőtlenítésére. Az állattenyésztésben többek között tojások mosásához, húsfeldolgozáshoz, fertőzések visszaszorításához, és a haszonállattartó telepek épületeinek fertőtlenítéséhez használható. A baktérium-, vírus- és gombaellenes hatása miatt a növénytermesztésben alkalmazott növényvédőszerke, egyéb vegyszerek, valamint az állattenyésztésben használt antibiotikumok biztonságos és környezetbarát alternatívájaként tartják számon, ugyanis a használatuk során meglehetősen kevés talaj- és vízszennyező maradékanyag keletkezik, miközben az emberek és állatok egészségét sem veszélyezteti [29]. Egy tanulmányban kimutatták, hogy a hipoklórossav alkalmas lehet a szubklinikai tőgygyulladás kezelésére is [37]. A HOCl a fibroblaszt és keratinocita migrációt elősegítő, valamint biofilmellenes hatása miatt ideális szer a krónikus sebek kezelésére [38] és a légyszervi fertőzések kontrollálására is hatékonyak bizonyult [39].

### **2.3.1 Az aktív HOCl hatásmechanizmusa, mikróballenes hatása**

A HOCl erős antimikrobiális aktivitása annak tulajdonítható, hogy elektromos semlegességének és kis moláris tömegének köszönhetően passzív diffúzióval könnyedén penetrál a baktérium sejtmembránján keresztül [23], ezáltal számos biomolekulával (pl.: kéntartalmú aminosavakkal, lipidekkel, nukleinsavakkal) és membrán alkotóelemmel kölcsönhatásba lép, súlyos sejtkárosodást okozva [21]. A sejtmembrán kén- és vastartalmú enzimjeivel és strukturális proteinjeivel való irreverzibilis reakciója következtében a membrán légzőfunkciója sérül, csökken a sejtek tápanyag- és oxigénfelvétele, így a sejt elveszíti életképességét és elpusztul [25, 38]. A membrán alkotóelemeivel való reakció következtében károsodnak az energia átviteléért és szállításáért felelős fehérjék, ami gyors adenzin-trifoszfát (ATP) hidrolízist eredményez, továbbá az ATP-áz enzim gátlásával

megzavarja a membránhoz kapcsolt ATP termelő folyamatokat. A HOCl hatására a peptidkötések felszakadnak, ami a fehérjék és aminosavak feldarabolódásához, illetve a fehérjék harmadlagos szerkezetének megváltozásához vezet, így az esszenciális bakteriális fehérjék irreverzibilis kicsapódása következik be, ami végül a baktérium pusztulását eredményezi. A HOCl a translációban és transzkripcióban résztvevő fehérjékkel is kapcsolatba lép, melynek következtében gátolja a fehérje- és dezoxiribonukleinsav (DNS) -szintézist, megállítva ezzel a baktériumok növekedését [21]. A HOCl és a DNS nukleotidjainak imino (NH) csoportjai közti reakció eredményeként képződött reaktív klóraminok a hidrogénkötések felszakítása és nitrogénygyökök képzése révén a kettős szálú DNS szálainak szétválásához vezet [40]. A HOCl lipidekkel való reakciója során a hagyományos lipideknél polárisabb klórhidrin keletkezik, amely a sejtmembrán szerkezetének és funkciójának megzavarásával a baktériumsejt lízisét eredményezi [41].

A HOCl *in vitro* körülmények között, pH 5-6-on kitűnő mikrobaölő (baktérium, vírus, gomba, alga) és biofilmellenes hatással rendelkezik, aktívan behatol a biofilmbe, és megöli az ott lévő mikroorganizmusokat, továbbá rövid időn belül képes elpusztítani a spóráképző baktériumokat is [23, 29, 38]. A HOCl-t szubletális koncentrációban alkalmazva a károsodást szenvedett baktériumok regenerálódnak, és még intenzívebb biofilmtermelésbe kezdenek. A biofilmek összetettsége és metabolikus diverzitása miatt a HOCl-re adott válaszuk kevésbé kiszámítható, mint a planktonikus sejtek esetében [21].

A HOCl klóraminok és nitrogén-gyökök képzésén keresztül kevesebb mint egy perc alatt képes inaktiválni bizonyos vírusokat, beleértve a koronavírusot is. Kétszáz ppm koncentrációban egy perc alatt, míg tízszeresére hígítva, húsz ppm koncentrációban 10 perc alatt képes elpusztítani a norovírusot és egyéb enterális vírusokat [6]. Ötven ppm HOCl szignifikáns csökkenést eredményez a patogén *E. coli*, *E. coli O-157*, *S. aureus*, *meticillin-rezisztens S. aureus (MRSA)*, *Salmonella enterica (S. enterica)*, *P. aeruginosa* számában. A ClO<sup>-</sup> esetén ugyanezen hatás eléréséhez jóval magasabb – 200 ppm és 500 ppm – koncentrációra van szükség. Négy ppm-nél nagyobb koncentrációjú HOCl-t adagolva több ezer bakteriális telepformáló egységet (CFU) tartalmazó tó vizéhez, a mikrobaölő hatás teljesnek bizonyult, ennél kisebb koncentrációt (<4 ppm) alkalmazva azonban már csak részleges antimikrobiális hatás mutatkozott [25]. A HOCl alkalmazását követő 5 percen belül 20 µM (20 ppm) HOCl a baktériumnövekedés 50%-t ( $5 \times 10^8$  *E. coli*/ml), míg 50 µM (50 ppm) HOCl a sejtosztódás 100%-át képes volt gátolni. Az 5 perces, 50 µM (50 ppm) HOCl-nek való kitettség a DNS-szintézist 96%-kal csökkentette, azonban a fehérjeszintézis

gátlása ennyi idő után csupán 10-30%-os volt, 30 perc után viszont 80%-ra emelkedett. Öt  $\mu\text{M}$  (5 ppm) HOCl alatti koncentráció esetén a bakteriális membrán károsodása és a fehérjék lebomlása nem volt tapasztalható [30]. Egy kutatás alapján a HOCl 0,1 és 2,8  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációban széles spektrumú antimikrobiális hatást mutatott. A minimális baktericid koncentráció (MBC) *E. coli* esetén 0,7  $\mu\text{g/ml}$ , *P. aeruginosa* esetén 0,35  $\mu\text{g/ml}$ , *S. aureus* esetén 0,173  $\mu\text{g/ml}$ , *Candida albicans* (*C. albicans*) esetén 2,7  $\mu\text{g/ml}$  volt [39]. A stabilizált HOCl oldat MBC-ja 64x hígításnak (3 ppm = 3  $\mu\text{g/ml}$ ) felelt meg a *P. aeruginosa* esetén, és 32x és 64x (3-6 ppm = 3-6  $\mu\text{g/ml}$ ) hígítás volt a *S. aureus* és a *C. albicans* esetén. Ezeket a koncentrációkat alkalmazva a mikroorganizmusok 12 másodpercen belül elpusztultak. A mikroorganizmusok által termelt biofilm gyengítésére irányuló hatékony dózis 32x és 16x hígításig volt megfigyelhető. Az MBC és a minimális fungicid koncentráció (MFC) értéke (1. táblázat) a biofilmellenes koncentrációval megegyezett [38].

1. táblázat Stabilizált HOCl esetén tapasztalt MBC és MFC értékek egyes baktérium- és gombafajok esetén

Faj	MBC és MFC (hígítás)
<i>S. aureus</i>	1/32 = 6 ppm; 1/64 = 3ppm
<i>P. aeruginosa</i>	1/64 = 3ppm
<i>C. albicans</i>	1/32 = 6 ppm; 1/64 = 3ppm

A celluláris homeosztázis fenntartása érdekében a mikroorganizmusoknak alkalmazkodniuk kell a HOCl okozta oxidatív stressz által létrejött károsodáshoz, ehhez az anyagcseréjük megváltoztatására, valamint transzkripciós faktorok által szabályozott válaszmechanizmus indukálására van szükség. Ez a folyamat azonban túl lassú ahhoz, hogy felvegye a versenyt a HOCl és az aminosav-oldalláncok közti gyors reakcióval, ezért a baktériumsejtek a HOCl okozta stressz hatására azonnal aktiválják az ún. chaperonokat, másnéven dajkafehérjéket. Ezek olyan hősokk-fehérjék, amelyek kulcsfontosságúak a HOCl okozta oxidatív stressz elleni hatékony válaszreakció kialakításában, ugyanis a többi fehérjéhez kapcsolódva megakadályozzák azok hibás feltekeredését és a letális fehérje aggregátumok kialakulását [21].

### 2.3.2 A HOCl stabilitása, alkalmazása

A HOCl számos mikroorganizmus ellen magasabb mikrobaölő hatást mutat, mint a nátrium-hipoklorit [25], ugyanakkor kevésbé stabil a különböző környezeti tényezőkkel szemben, ugyanis az ultraibolya sugárzás, a napfény, a levegővel való érintkezés és a magasabb hőmérséklet (>25 °C) hatására veszít a stabilitásából [6, 25]. A HOCl oldatot

napfénynek kitett helyen tárolva, az oldat klór koncentrációjának csökkenése a 4. napon, míg napfénytől védett helyen tárolva a 14. nap után következnek be [42]. Ezért fontos, hogy az oldatot fénytől védett, hűvös helyen ( $<10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) tároljuk, miközben a levegővel való érintkezést minimalizáljuk, így az oldatban a HOCl molekulák koncentrációja és mikrobaölő aktivitása megőrizhető. Az oldatban található amino csoport ( $\text{NH}_2$ ) vagy szénhidrát (CHO) tartalmú szerves vegyületek, valamint a szerves ionok ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{PO}_3^-$ ,  $\text{Fe}_2^+$ ,  $\text{Cu}_2^+$  és  $\text{CuS}$ ) oxidációs reakciók révén szintén csökkentik a HOCl oldat stabilitását, koncentrációját és mikrobaölő aktivitását, ezért az oldat előállításához olyan tiszta vízre van szükség, amely a lehető legkisebb koncentrációban tartalmazza ezeket a szerves és szerves ion komponenseket [25].

A HOCl oldat alkalmazása a felhasználás célja szerint különböző módszerekkel lehetséges, például áztatással, öblítéssel, ködképzéssel, permetezéssel [29]. Ezek közül a permetezés és a ködképzés rendkívül hatékony módja nagyobb területek fertőtlenítésének [29], ugyanis a folyamat során  $20\text{ }\mu\text{g}$ -nál kisebb méretű aeroszol köd képződik [6]. A ködösítés azonban megváltoztathatja a fertőtlenítőszer fizikai és kémiai tulajdonságait, a folyamat során feltehetően a klórgáz elpárolgása miatt megközelítőleg 70%-kal csökken az aktív hatóanyag, azaz az oldatban rendelkezésre álló szabad klór koncentrációja, miközben az oldat pH-ja nő [6].

#### **2.4 Az egyes baktériumok és gombák járványtani jelentősége**

Az *E. coli* egy Gram-negatív baktérium, az *Enterobacteriaceae* baktériumcsalád egyik fő képviselője. Az *E. coli* baktériumok többsége az emberek és melegvérű állatok gyomor-bél traktusának legelterjedtebb kommenzalista lakói, ugyanakkor a fakultatív patogén és patogén törzsek elsősorban az immunhiányos egyedekben, vagy a gastrointestinalis barrier károsodásakor súlyos bakteriális fertőzéseket okozhatnak [43, 44]. A nagyüzemi haszonállattartó telepeken előforduló hajlamosító tényezők, mint például a magas állománysűrűség, illetve a nem megfelelő higiénia hatására az *E. coli* által előidézett betegségek elterjedése főleg a baromfi, a sertés és a szarvasmarha ágazatot érinti, a többi állatfaj esetében a kórokozó inkább szórványos megbetegedést eredményez [45]. Az *E. coli* törzseket két csoportra oszthatjuk az általuk okozott megbetegedés szervezetben való lokalizációja alapján. Az extraintestinalis *E. coli* törzsek felelősek elsősorban az agyhártyagyulladás és vérfertőzéssel, valamint a húgyúti fertőzéssel járó megbetegedésekért, továbbá ide tartoznak a madárpatógén *E. coli* törzsek is [46]. Az intestinalis *E. coli* törzseket a virulencia faktorok típusai és az általuk okozott klinikai

tünetek alapján további patotípusokba sorolhatjuk, melyek közül az enteropatogén *E. coli*-nak (EPEC), az enterohemorragiás *E. coli*-nak (EHEC) és az enterotoxikus *E. coli*-nak (ETEC) van állategészségügyi jelentősége [44]. Az EPEC felelős elsősorban a gyerekek és állatok rossz higiéniai körülmények között kialakuló hasmenéssel járó megbetegedéseikért [43]. Az EHEC vérzéses hasmenéssel járó vastagbélgyulladást okozhat az emberekben és borjakban, ödémabetegséget a sertésekben [45]. Megemlítendő továbbá, hogy az *E. coli* a tehének halálos kimenetellel végződő tőgygyulladásának leggyakoribb kórokozója [47]. Az *E. coli* törzsek ellen alkalmazott terápiás kezelések sikerességét a multirezisztens *E. coli* törzsek világszerte növekvő elterjedtsége nehezíti [43].

A *S. aureus* egy Gram-pozitív, koaguláz pozitív gennykeltő baktérium, amely természetes körülmények között is megtalálható a környezetünkben, valamint az emberek és állatok bőrén, az emésztőcsatornában, a felső légutakban, a nemi szervek és húgyutak nyálkahártyáin. A bőr és nyálkahártya sérüléseinek bejutva gennyesedéssel járó, lokalizált megbetegedéseket idéz elő, többek között bőrgyulladást, hallójárat-gyulladást, tályogképződést, méhgyulladást és tőgygyulladást [48]. A tejhasznú tehenészetekben előforduló nagy gazdasági veszteségeket okozó tőgygyulladás vezető oka világszerte a *S. aureus* [49]. A baktérium jellemzően a tejtermelés csökkenésével és a tejminőség romlásával járó, jellegzetes tüneteket azonban nem produkáló szubklinikai tőgygyulladást okoz. Ritkább esetben akut vagy perakut klinikai tőgygyulladás is kialakulhat, amely az ellés utáni első hetekben az állat hirtelen elhullásával járhat. A fertőzés átvitelében maguk a fertőzött állatok játszik a legfontosabb szerepet [50]. A kórokozó által termelt toxinok és extracelluláris enzimek megzavarják a gazdaszervezet immunválaszát, hozzájárulva ezzel a baktérium fertőzőképességének és túlélési sikerének növeléséhez [51]. A *S. aureus* biofilmtermelő képessége védelmet biztosít az antibiotikumokkal szemben, amely nagyban megnehezíti a tőgygyulladás sikeres gyógykezelését, ezért nagyon fontos a telepi higiénia fenntartásával a fertőzés megelőzésére törekedni [52, 53]. A *S. aureus* az emberekre is komoly veszélyt jelenthet, szerepet játszik például bőr- és lágyrész fertőzések, tüdőgyulladás, szívbelhártya gyulladás, csontvelőgyulladás, szeptikus ízületgyulladás kialakításában [54].

A *S. enterica* az *Enterobacteriaceae* családba tartozó, embereket és állatokat egyaránt megbetegítő invazív, fakultatív anaerob Gram-negatív intracelluláris baktérium, a fejlett országok egyik legfontosabb élelmiszer-eredetű fertőzéseket előidéző kórokozója, továbbá kifejezetten nagy jelentőséggel bír a baromfi- és sertés ágazatokban [11, 55–57]. A

kórokozó hosszú ideig képes túlélni a környezetben, és elsősorban fertőzött élelmiszerekkel (tojás, hús, hal, zöldség, gyümölcs) és vízzel terjed [55, 58]. Egy tanulmány szerint a Hollandiában kimutatott humán szalmonella-fertőzések 15%-ért a sertéshús és az abból készült termékek a felelősek [59]. A baktérium szerotípusától és a gazdaszervezet immunrendszerének állapotától függően különböző lefolyású megbetegedéseket okozhat [56]. Baromfik esetében említésre méltó a baromfi paratífuszt okozó *Salmonella Gallinarium*, valamint az akár 100%-os mortalitással is járó baromfi tífusz kórokozója, a *Salmonella Pullorum* [55]. A szarvasmarhák szalmonellózisát okozó legelterjedtebb szerovariánsok a *Salmonella Typhimurium* és a *Salmonella Dublin*, melyek elsősorban a borjak hasmenéssel járó gyomor- és bélgyulladását idézik elő [60]. A sertéseket megbetegítő szalmonellák legfontosabb képviselője a *Salmonella Choleraesuis*, amely fiatal sertések magas mortalitással járó szeptikémiáját okozza [55]. Egy tanulmányban a gazdaságokban használt fertőtlenítőszeres *Salmonella* spp. elleni hatását reprezentálták száraz és nedves környezetben. A klórkrezol alapú fertőtlenítőszeres egy folyamatos, magas arányú *Salmonella*-ölő hatást biztosítottak mindkét környezetben, míg a formaldehid csupán a száraz modellben bizonyult magas hatékonyságúnak, a glutáraldehid pedig változó hatékonyságot mutatott. A kísérletben vizsgált egyéb kémiai vegyületek – a kvaterner ammónium vegyületek, az amfoter felületaktív anyagok, a jódtartalmú készítmények, peroxigének – mérsékelt hatással rendelkeztek a *Salmonella* spp.-re nézve. [11].

A *P. aeruginosa* egy Gram-negatív opportunistá baktérium [61]. Humán- és állategészségügyi területen egyaránt hatalmas jelentőséggel bíró kórokozó, amely a kórházi fertőzéseket okozó baktériumfajok közül az egyik legjelentősebb, továbbá szerepet játszik haszonállatok és társállatok bizonyos betegségeinek kialakításában, például kutyák és macskák fülgyulladásában, húgyutakat és bőrt érintő fertőzéseiben, tejelő tehenek és kecskék tőgygyulladásában, nyércek és rókák vérzéses tüdőgyulladásában, lovak méhgyulladásában, csincsillák tüdő- és bélgyulladásában, szeptikémiájában. [62, 63]. A terápiás lehetőségeink meglehetősen korlátozottak egy *P. aeruginosa* fertőzés esetén, ugyanis ez az ún. superbaktérium hatalmas rezisztenciaképző képességgel rendelkezik, ezáltal számos antibiotikummal szemben rezisztens. A rezisztencia elsősorban a baktérium külső membránjának alacsony permeabilitása miatt alakul ki, ami lassítja az antibiotikumok penetrációjának a sebességét [64]. A gyógykezelés sikerességét nehezíti továbbá a *P. aeruginosa* erőteljes biofilmképző tulajdonsága is [65].

A *C. albicans* a sarjadzógombák osztályába tartozó opportunistá patogén gombafaj, mely gyakran az egészséges szervezetben is megtalálható a bél mikrobiomjának részeként [66]. Az immunrendszer gyengülése, valamint bizonyos tényezők (gyógyszerek, allergia) hatására azonban felborulhat a mikrobiom egyensúlya, ami a gomba elszaporodásához vezethet [66, 67]. A *C. albicans* felelős az emberek és állatok (szopós malac, borjú, madár) hüvely-, száj- és egyéb nyálkahártyáit érintő fertőzésekért, valamint különösen az immunszuppresszált és antibiotikum terápia alatt álló egyedekben a szeptikémia, a peritonitis és az agyhártyagyulladás kialakításáért [67–69]. A gombás megbetegedések mindennaposá váltak a baromfi- és sertéságazatban, és a rutinszerűen alkalmazott fertőtlenítő intézkedések ellenére potenciális gazdasági veszteséget és egészségügyi kockázatot jelentenek az emberekre és az állatokra nézve [70]. Egy új tanulmány szerint a *C. albicans* kiválóan túlél a tojótyúktojásain, így a kontaminált tojásokkal való érintkezés is negatív hatással lehet az állatok és emberek egészségére. A kórokozó terjedését az is elősegíti, hogy a különböző gombafajoknak, a tenyésztett-, és vadon élő madarak nitrogéntartalmú vegyületekben gazdag bélsara egyfajta szubsztrátként szolgál [69]. A gombás fertőzések megelőzésének fontos eleme a higiénia megfelelő betartása, az antifungális hatású fertőtlenítőszer alkalmazása, az immunrendszer erősítése [67]. A *C. albicans* biofilmtermelő képessége csökkenti a gomba antimikrobiális szerekekkel szembeni érzékenységét, ezáltal jelentősen hozzájárul a kialakult gombás, illetve kevert kóroktanú sebfertőzések lassabb gyógyulásához [71, 72]. A tehének gombák okozta tőgygyulladás általában másodlagosan alakul ki, és iatrogén okokra vezethető vissza. A fejések, illetve a bakteriális eredetű tőgygyulladások kezelése során helytelenül letisztított eszközök alkalmazása hajlamosít a betegség kialakulására, melynek hátterében túlnyomórészt a *C. albicans* elszaporodása áll [73].

## 2.5 A biofilmek jelentősége az állatorvoslásban

Természetes körülmények között egyes baktérium- és gombafajok biofilmet képeznek a felületeken, ami segíti a köztük lévő kommunikációt, hozzájárulva ezzel a virulencia növekedéséhez, valamint az antimikrobiális szerekekkel és a káros környezeti tényezőkkel szembeni rezisztencia kialakulásához, miközben védelmet biztosít számukra a gazdaszervezet immunrendszerével szemben [38, 74]. A biofilm fő alkotóeleme a benne található mikroorganizmusok által termelt extracelluláris polimer anyagokból (EPS) álló mátrix (DNS, poliszacharid, fehérje), amely a kórokozók egymáshoz és felülethez történő tapadását segíti elő [75]. A biofilm kialakulása során a szabadon úszó mikroorganizmusok a



felszínhez rögzülnek, sokszorozódnak, EPS mátrixot termelnek, és mikrokolóniákat hoznak létre. Végző lépésként lezajlik a biofilm érése, melyet követően a benne található mikroorganizmusok kiszabadulnak, szétszóródnak, és új felületeken telepednek meg kialakítva ezzel egy önálló vagy akár az eredetivel összefüggő biofilmréteget [76].

A biofilm fontos szerepet játszik a krónikus bakteriális fertőzések kialakításában, valamint az olyan fertőzések esetén is, ahol a baktériumok a beültetett orvosi eszközök révén lépnek kapcsolatba a szervezettel [21]. Egyes becslések szerint a humán perzisztens bakteriális fertőzések 60-80 %-áért a biofilmben található baktériumok a felelősek [76], melyek a planktonikus formánál akár 1000-szer is toleránsabbak lehetnek [77]. A megnövekedett toleranciának számos oka lehet, beleértve a biofilmben található sejtek alacsonyabb metabolikus aktivitását, az anaerob mikróbák fejlődésének kedvező oxigénhiányos környezetet, és a környezet káros hatásai ellen védelmet biztosító EPS mátrix jelenlétét [21].

Az orvosi eszközök felületén leggyakrabban biofilmet termelő mikroorganizmusok közé a *S. aureus*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, valamint a *Serratia* és *Proteus* fajok tartoznak, míg az emberek és állatok szervezetében a legfontosabb biofilmtermelő képességgel rendelkező fajok a *Staphylococcus* spp., *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *Malassezia pachydermatis* [78–81]. A haszonállattartó telepeken előforduló egyik legjelentősebb megbetegedés a bakteriális tögygyulladás, melynek kialakításában szerepet játszó baktériumok (*S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *E. coli*) szintén rendelkeznek biofilmtermelő képességgel [82].

### 3 CÉLKITŰZÉSEK

Tanulmányunk fő célja egy olyan hazai, innovatív, aktív HOCl tartalmú fertőtlenítőszer hatékonyságának vizsgálata, mely az állattartó telepeken alkalmazott fertőtlenítő hatású anyagok környezetbarát alternatívája lehet. A HOCl tartalmú fertőtlenítőszer hatékonyságát elsődlegesen humán patogénekkal szemben vizsgálták, az állatgyógyászatban releváns kórokozók elleni hatásukkal kapcsolatban meglehetősen kevés tanulmány született.

Kutatásunk során Magyarországon izolált, négy különböző állati eredetű baktériumfajon (*E. coli*, *S. aureus*, *S. enterica*, *P. aeruginosa*) és egy gombafajon (*C. albicans*) tanulmányoztuk a HOCl tartalmú fertőtlenítőszer *in vitro* hatékonyságát és antimikrobiális hatását a MIC értékek, MBC és MFC értékek, valamint ölési görbék meghatározásával. Az antimikrobiális szerekkel szembeni rezisztenciához hozzájárul ezen kórokozók biofilmtermelése is, ezért a készítmény biofilmellenes hatását is tanulmányoztuk MTS-formazán vitális festési eljárással.

Vizsgáltuk, hogy az aktív HOCl tartalmú fertőtlenítőszer hatékony alternatívának bizonyulhat-e az *in vitro* vizsgálati eredmények alapján az állattartó telepeken előforduló különféle kórokozók számának csökkentésére, valamint azok elpusztítására, ezáltal a megfelelő higiéniai körülmények biztosítására, mely hozzájárul az állatokat érintő fertőzések, járványok kitörésének megakadályozásához.

## 4 ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1 A HOCl fertőtlenítőszer

Vizsgálataink során egy hipoklórossav tartalmú, környezetbarát (Biokontroll Hungária Nonprofit Kft. tanúsítvány), 100%-ban lebomló fertőtlenítőszer hatékonyságát vizsgáltuk állati eredetű baktérium- és gombatörzseken. A hipoklórossav egy széles spektrumú, gazdaszervezetre ártalmatlan vegyület, fertőtlenítő ereje nagyobb, mint a többi aktív klórtartalmú készítményé. Az általunk vizsgált fertőtlenítőszer abban különbözik a hagyományos klórtartalmú fertőtlenítőszerektől, hogy az inaktiváló hatását nem vegyi úton fejt ki, hanem molekulárisan, ugyanis a fertőtlenítő hatás elérésben nem az OCl<sup>-</sup> játszik szerepet, hanem a HOCl, amely elektromos semlegességének köszönhetően akadálytalanul képes a mikroorganizmusok negatív töltésű sejtfalán áthatolni, és elpusztítani azokat.

Az általunk vizsgált HOCl tartalmú fertőtlenítő hatású készítményt korábban állatokból izolált baktériumok, gombák ellen *in vitro* nem tesztelték, valamint biofilmellenes hatékonyságával kapcsolatos vizsgálatokat sem végeztek.

### 4.2 A vizsgált baktérium- és gombatörzsek

A kutatásunk során felhasznált 8-8 db *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. enterica*. és *C. albicans* törzsek (**2. táblázat**) a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék korábbi kutatásai során, gazdasági haszonállatokból izolált törzsek voltak. A vizsgálatot megelőzően a törzsek -80 °C-on *Microbank*<sup>TM</sup> rendszerben voltak tárolva (Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Kanada).

2. táblázat. A vizsgált mikróbafajok és a fajon belül vizsgált törzsek száma

<i>Escherichia coli</i>	7 törzs + ATCC <sup>TM</sup> biofilmtermelő törzs
<i>Staphylococcus aureus</i>	7 törzs + ATCC <sup>TM</sup> biofilmtermelő törzs
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7 törzs + ATCC <sup>TM</sup> biofilmtermelő törzs
<i>Salmonella enterica</i>	8 törzs
<i>Candida albicans</i>	8 törzs

A kísérlet kezdetekor a kiindulási CFU szám, a MIC értékek, az MBC és MFC értékek és az ölési görbe meghatározásához a baktérium törzseket a növekedésükhöz szükséges tripton-szója táplevesben (TSB), a gomba törzseket Sabouraud levesben szaporítottuk fel. Steril kémcsöveket 3-3 ml táplevessel töltöttünk fel, melybe minden

törzsből 2-2 db mikrobankban tárolt gyöngyöt oltottunk. Ezt követően a kioltott törzseket 37 °C-on, 18-24 órán keresztül inkubáltuk a termosztátban.

A biofilmellenes vizsgálat során a baktérium- és gombatörzseknél egyaránt Müller-Hinton (MH) levest használtunk, ugyanis a TSB és a Sabouraud táplevesek befolyásolják a vizsgálatához használt MTS-formazán vitális festési eljárást. A szükséges táptalajokat a Biolab Zrt. (Budapest, Magyarország) biztosította számunkra.

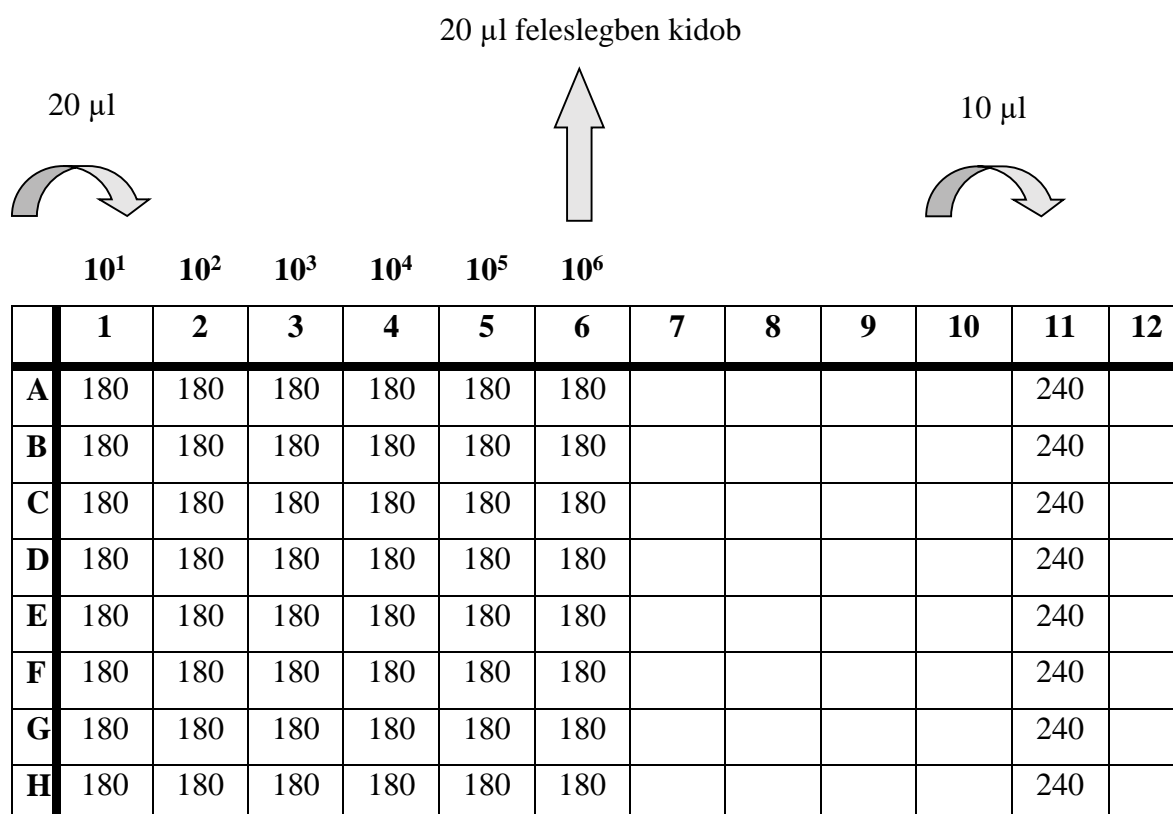
### 4.3 Kiindulási CFU meghatározása

A fertőtlenítőszer MIC értékeinek meghatározáshoz először meg kellett állapítanunk a kiindulási szuszpenzióban található mikrobák számát. A kísérlet során vizsgált 40 törzset a kémcsövekben található levesekhez adtuk, majd 18-24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk őket a baktériumok és gombák felszaporítása céljából. Ezt követően egy 96 lyukú mikrotiter lemezen elkészítettük a szuszpenzió tízes alapú hígítási sorát. A lemez oszlopaiba 180 µl TSB levest töltöttünk. A baktériumokat és gombákat tartalmazó kémcsöveket fél percig vortex-szel kevertük, hogy a kémcső aljára leülepedett baktériumok és gombák elkeveredjenek a táplevesben, majd ebből 20 µl-t pipettáztunk a mikrotiter lemez már 180 µl levest tartalmazó 1. oszlopába, amit 3-4x alaposan szuszpendáltunk pipettával, majd felszívunk belőle 20 µl-t és tovább pipettáztuk a 2. oszlopba. Ezt a műveletet ismételtük a 6. oszlopig, ahonnan a keverést követően a pipettahegyekkel feleslegben a 20 µl-t kidobtunk (1. lépés). A munkalemez 11. oszlopa a MIC érték meghatározásához szükséges ún. segédoszlop funkcióját töltötte be, ahova 240 µl leveshez 10 µl baktérium- és gombaszuszpenziót mértünk be, ezzel a vizsgált baktérium és gomba törzsek 25x hígítását (2. lépés) készítettük elő a MIC érték meghatározásához (**1. ábra**). Erre azért volt szükség, hogy standard mennyiségű baktériumot, illetve gombát oltsunk be a hígítási sort tartalmazó lemezekre.

Ilyen formában a munkalemez első hat oszlopának lyukaiban 180 µl tápleves volt, melyben a 6. oszlopig a vizsgált baktérium és gomba törzseket tízes alapon végig hígítottuk, a 11. oszlop pedig 250 µl tápleves és baktérium szuszpenzióját tartalmazta.

## 1. lépés: 10-es alapú hígítás

## 2. lépés: 25x hígítás



**1. ábra** A mikrobák beoltása, a tízes alapú hígítási sor elkészítése (1. lépés), valamint a segédoszlopként szolgáló 11. oszlopban az adott mikróbatörzset (A-H11) tartalmazó szuszpenzió 25x-ös hígításának elkészítése a MIC meghatározásához szükséges kezdeti koncentráció beállításához (2. lépés).

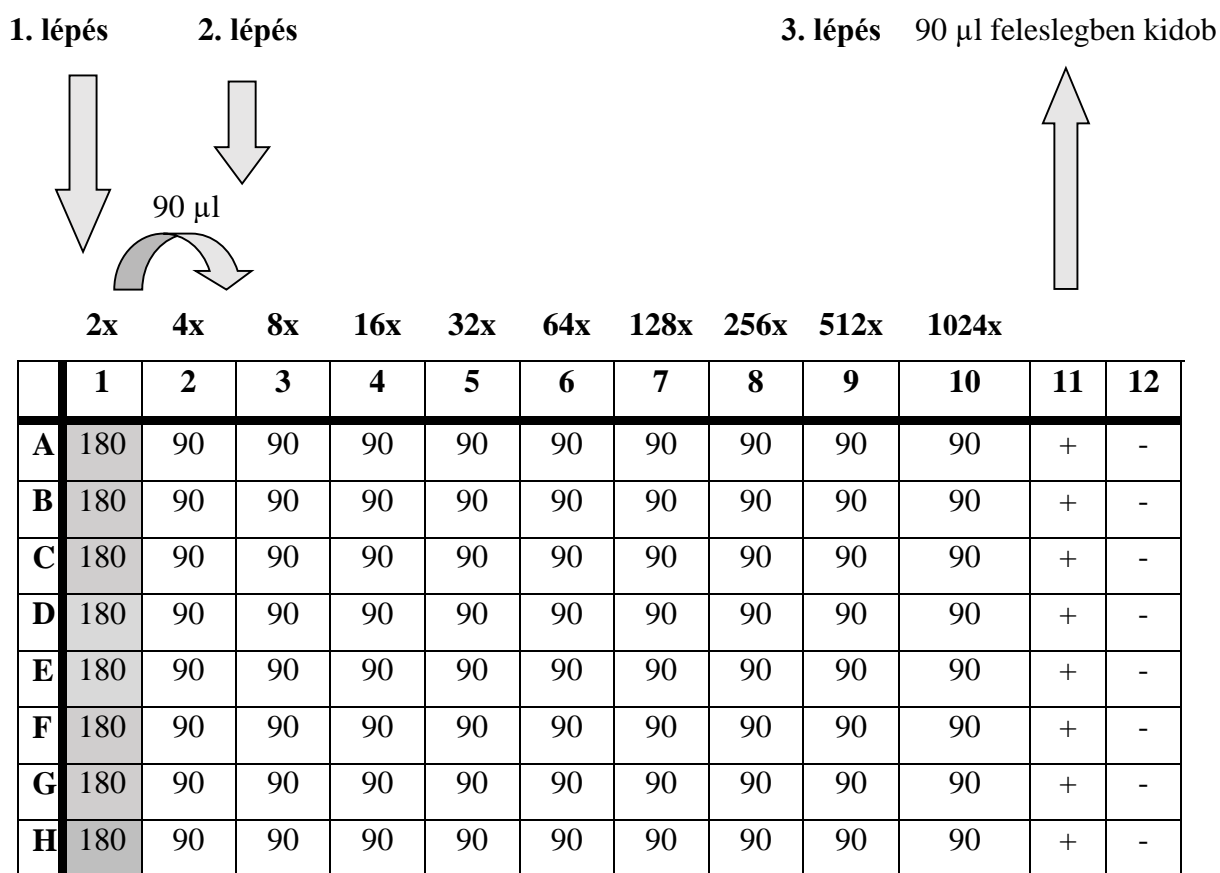
A kezdeti CFU meghatározáshoz a tízes alapú hígítási sor  $10^3$ , a  $10^4$ , a  $10^5$  és a  $10^6$  hígításokból 100-100 µl-t oltottunk ki tripton-szója agart (TSA) tartalmazó Petri-csészékre. A kiindulási szuszpenzió CFU/ml értékének meghatározásához az adott hígítási fokon megszámlolt CFU értéket megszoroztuk a hígítás fokával. Ezt követően kiszámoltuk a MIC érték meghatározásához szükséges kiindulási baktérium- és gombaszámot, amihez a segédlemezen elkészített 240+10 µl hígítást, mint 25x hígítást, valamint a törzsoldatból kivett 10 µl, mint további 100x hígítást (1 ml-nek a 1/100-ad része), összesen tehát a törzsszuszenzió 2500x hígítását vettük alapul.

### 4.4 MIC érték meghatározása

A hipoklórossav antimikrobiális hatását a MIC értékek meghatározásával vizsgáltuk, amelyet mind a 40 vizsgált törzs esetében elvégeztünk. A MIC az antimikrobiális hatású anyagok azon legkisebb koncentrációja, amely még hatásosan gátolja az adott baktérium- vagy gombatörzs növekedését *in vitro*. A steril kémcsöveket 1-től 40-ig feliratoztuk a törzseknek megfelelően. Összesen 4 db baktériumtörzset tartalmazó lemezt, 1 db

gombatörzseket tartalmazó lemezt, valamint 1 db segédlemezt használtunk fel, melyeket a törzseknek megfelelően feliratoztunk. A kísérlet során a MIC meghatározást a Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI) ajánlásainak megfelelően kétszer megismételtük.

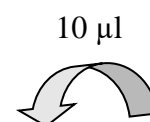
A tömény fertőtlenítőszerből egy kétszeresére hígított törzsoldatot készítettünk TSB vagy Sabouraud leves felhasználásával centrifugacsövekben. A vizsgálathoz a szavatossági idő végén garantált 0,35 mg/ml aktív klórtartalomtól indultunk ki, melynek kétszeres hígítása 0,175 mg/ml koncentrációnak felel meg, tehát a 96 lyukú mikrotiter lemez 1. oszlopába 175 µg/ml koncentrációt tartalmazó 180 µl törzsoldat került bemérésre (1. lépés), míg a többi oszlopot 90 µl levestel töltöttük fel. Ezt követően elkészítettük a hatóanyag kettes alapú hígítási sorát. Az első oszlopban található törzsoldatból 90 µl-t pipettáztunk a 2. oszlopba, 3-4x alaposan szuszpendáltuk a pipettával a hozzáadott mennyiséget, majd ezt a folyamatot ismételve haladtunk tovább a 10. oszlopig (2. lépés), amelyből a keverés után visszaszívott felesleges 90 µl-t kidobtuk, így minden lyuk egyenlő mennyiségben 90 µl szuszpenziót (3. lépés) tartalmazott (2. ábra).



2. ábra A törzsoldat bemérése (1. lépés), a kettes alapú hígítási sor elkészítése (2. lépés) és a 90 µl feleslegben való kidobása (3. lépés)

A kettes alapú hígítási sort tartalmazó lemezek 11. oszlopától kezdve minden lyukba 10 µl baktérium- vagy gombaszuszpenziót mértünk be. A lemezen található 11. oszlop szolgált a pozitív kontrollként, amelybe az 1-10. oszlophoz hasonlóan tápleves és baktériumszuspenzió is került (4. lépés), viszont fertőtlenítőszer azoktól eltérően ide nem tettünk. A lemezen található 12. oszlop volt a negatív kontroll, amely csak táplevest tartalmazott, baktériumot és fertőtlenítőszer nem (**3. ábra**).

#### 4. lépés: baktériumszuspenzió bemérése



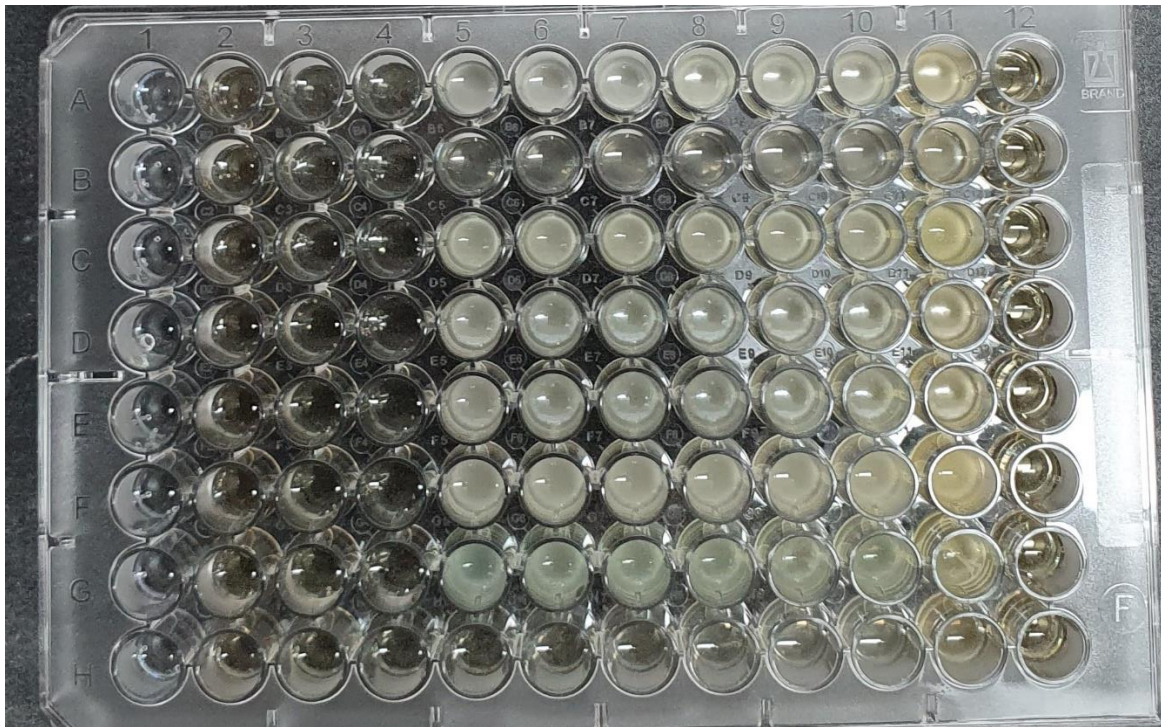
	2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1024x		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
B	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
C	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
D	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
E	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
F	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
G	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
H	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-

**3. ábra** A baktérium szuszpenzió bemérése a 11. pozitív kontroll oszloptól (4. lépés)

Ezt követően 18-24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk őket, majd a pozitív és negatív kontrollokhoz viszonyítva elbíraltuk a MIC értékeket, a **3. táblázatban** látható szempontok alapján. A MIC vizsgálat eredményeinek megjelenését a **4. ábra** szemlélteti.

**3. táblázat** A MIC értékek elbírálásának szempontjai lyukanként egy adott mikrobatorzset adott fertőtlenítőszer koncentrációval kezelve

Jelölés	Tapasztalat	Értékelés
+++	jelentős mértékű zavarosodás	pozitív
++	mérsékelt zavarosodás	pozitív
+	enyhe zavarosodás	pozitív
+ -	enyhe zavarosodás, a baktérium növekedése nem megítélhető	negatív
-	nincs zavarosság	negatív



**4. ábra** Példa a MIC értékek elbírálására a pozitív (11. oszlop) és negatív (12. oszlop) kontroll mintákhoz képest (pl.: A11 +++, A10 ++, B10 +, A12 -)

#### 4.5 Az MBC és MFC értékek meghatározása

Az MBC és MFC érték az antimikrobiális hatóanyag azon legkisebb koncentrációja, ahol a baktériumszám és gombaszám legalább ezredrészére csökken. A vizsgálat célja az volt, hogy megállapítsuk, hogy képes-e baktericid és fungicid hatást kifejteni a fertőtlenítőszer. Az MBC és MFC vizsgálatot minden faj esetén egy törzsön végeztük el, törzsenként 4, azaz összesen 20 Petri-csészét felhasználva.

A vizsgálathoz az előzőleg meghatározott MIC értékeket jelölő lyukaktól balra helyezkedő 3 lyukból oltottunk át egy új lemezre mintát hígításhoz, hogy a CFU meghatározáshoz számolható mennyiségű baktériumot tartalmazzon a kioltandó minta. Az új lemez oszlopait 180 µl táplevessel töltöttük fel. Ennek az első oszlopába az adott lyukakból (lyukanként új sorba) 20-20 µl-t pipettáztunk, majd azt tízes alapon hígítottuk. Az első oszlopba bemért 20 µl-t szuszpendáltuk, majd átmértünk az 1. oszlopból 20 µl-t a másodikba és így tovább. Az 5. oszlopból a felesleges 20 µl-t a pipettahegygel kidobtuk. A  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  és  $10^5$  hígításból 100-100 µl-t helyeztünk a baktériumok esetén TSA agart, a gombák esetén Sabouraud agart tartalmazó Petri-csészékre, amit steril szélesztő kaccsal egyenletesen szélesztettünk az agar felületén. A mintákat tartalmazó Petri-csészék 18-24 órás, 37 °C-on történő inkubációját követően megszámláltuk a kinőtt telepeket.



#### **4.6 Az ölési görbék meghatározása**

Az ún. ölési görbéket fajonként egy-egy törzsön határoztuk meg, melyhez a CFU számokat az idő függvényében ábrázoltuk. Ehhez az antimikrobiális hatóanyag 2x és 4x hígított koncentrációjának vizsgálatát végeztük el. A mikróbaszuspenzióból a fertőtlenítőszer adott kezdőkoncentrációjával történő kezelést követően 6 különböző időpontban kentünk ki mintát Petri-csészére az inkubáció alatt, melyek 5', 10', 20', 30', 60' és 120' percek voltak. A koncentrációkat az MBC és MFC meghatározás eredménye alapján választottuk ki, mely értékek megegyeztek a MIC értékkel. A kiindulási CFU meghatározás alapján a baktériumszuspenzió célkoncentrációja  $10^7$  volt.

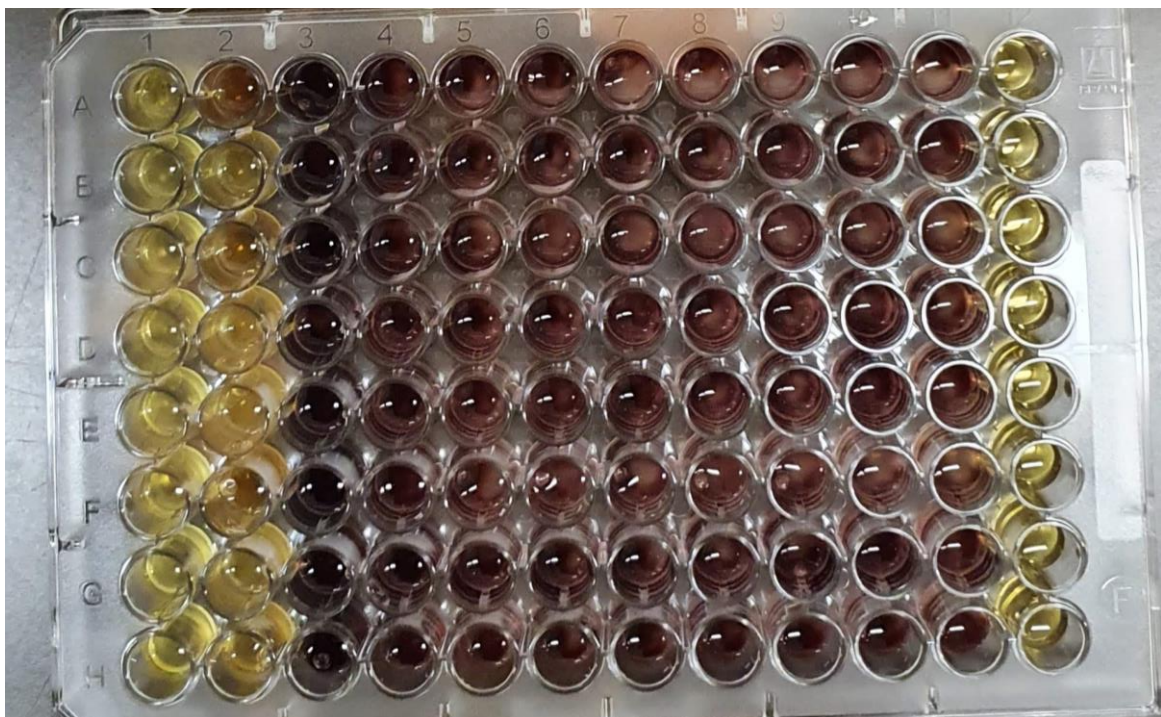
Először megállapítottuk a vizsgált fajok kiindulási mikróbaszámát, vagyis, hogy a fertőtlenítőszer hozzáadása nélkül mennyi a CFU-ja egy adott hígítású szuszpenziónak Petri-csészén szélesztve 18-24 órás inkubációt követően. Ehhez 250 ml-es üvegbe kellett  $10^6$ - $10^7$  baktérium és gomba koncentrációt beállítani. Az üvegekből közvetlenül kitettünk 50-50  $\mu$ l-t 3-3 párhuzamos Petri-csészére 10 000x, 100 000x, 1 000 000x és 10 000 000x hígításban. Ezekhez segédlemezen tízes alapú hígítási sort készítettünk. 180  $\mu$ l táplevessel töltöttük fel a lemez lyukait, és 20  $\mu$ l oldatot adtunk az első oszlop lyukaihoz, majd 20  $\mu$ l-t ebből végig hígítottunk, és a végén a felesleget eldobtuk. A 4-7. oszlopok feleltek meg a  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  hígításnak. A Petri-csészéken a 18-24 órás inkubációt követően megszámloltuk a telepeket.

Ezt követően kivettük az üvegből a kiindulási CFU-hoz a mintákat, hozzáadtuk a vizsgált fertőtlenítőszer, és előbb 2x hígításban, majd 4x hígításban vizsgáltuk azt. Készítettünk 5', 10', 20', 30', 60' és 120' perces munkalemezeket, melynek az összes lyukát 180  $\mu$ l TSA-val töltöttük fel. Az első oszlopba az időpontnak megfelelően a gomba- és baktériumszuspenzió 20-20  $\mu$ l-ét pipettáztuk, majd végig hígítottunk, így tízes alapú hígítási sort készítve. Ezen hígításokból kitettünk 100-100  $\mu$ l-t a TSA-t tartalmazó Petri-csészékre, majd steril kaccsal történő szélesztést követően 18-24 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on. Ezt követően minden hígítás esetében meghatároztuk a CFU-t, melyhez a kapott értéket megszoroztuk a hígítás mértékével.

#### **4.7 A biofilmellenes hatás vizsgálata**

A vizsgálathoz új munkalemezeket készítettünk, melyek minden oszlopába 90  $\mu$ l TSB levest pipettáztunk. Elkészítettük a baktériumhígító lemezt: 240  $\mu$ l leveshez 10  $\mu$ l baktériumszuspenziót mértünk, majd a hígított baktériumszuspenziókból 10  $\mu$ l-t

pipettáztunk a munkalemezek megfelelő oszlopaiba pozitív és negatív kontrolloszlopok használata mellett. A pozitív kontroll oszlopban növekvő biofilm nem kapott kezelést az inkubációs idő letelte után, a negatív kontroll oszlop pedig csupán a táplevest tartalmazta. A lemezeket a biofilmtermelés céljából 18-24 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on. Az inkubációt követően a termelt biofilmet tartalmazó munkalemez minden oszlopából steril körülmények között eltávolítottuk a felülúszót. Ezt a folyamatot kellő óvatossággal kell végezni annak érdekében, hogy a termelt biofilmek ne sérüljenek a leszívás során. A felülúszó eltávolítását követően a fertőtlenítőszer tömény, illetve 2x, 4x, 8x, 16x, 32x, 64x, 128x, 256x és 512x hígításával kezeltük a kialakult biofilmeket 18-24 órán keresztül 37 °C-on. A felülúszó steril, körültekintő eltávolítását követően végeztük el a biofilmellenes hatás vizsgálatához szükséges MTS-formazán vitális festést, melynek célja a lyukakban lévő biofilmben található életképes baktériumsejtek kimutatása, melyre a folyamat eredményeként létrejött színváltozásból következtethetünk.



**5. ábra** MTS-formazán vitális festés, mellyel a biofilmben található életképes baktériumsejtek számára a létrejött színváltozásból következtethetünk 492 nm-es elnyelési maximumú spektrofotometriás eljárás segítségével, a sorok az egyes törzseket, az oszlopok a kettes alapú hígítást jelölik, a 11. oszlop a pozitív kontroll, a 12. oszlop a negatív kontroll

A festési eljárás során 5:1 hígítási arányban MH leves - MTS oldat keverékét pipettáztuk a biofilmet tartalmazó lemezek minden lyukába, és 1,5 óras 37 °C-on történő inkubációt követően 492 nm-es elnyelési maximumú spektrofotometriás eljárás segítségével számszerűsítettük a színreakció mértékét, azaz az abszorbancia értékeket, amelyből következtettünk a biofilmbe ágyazott élő baktérium- és gombasejtek mennyiségére (**5. ábra**).

Az abszorbancia értékek segítségével, a pozitív kontrollokhoz viszonyítva kiszámoltuk a biofilmben lévő életképes mikrobák százalékos csökkenését. Ezt követően megállapítottuk a minimális biofilm gátló koncentráció (MBIC<sub>50</sub>) értéket az egyes törzseknél, amely azt a koncentrációját jelöli a vizsgált fertőtlenítőszernek, ahol a biofilmtermelő alakok legalább 50%-ban gátlódnak [83].

## 5 EREDMÉNYEK

### 5.1 Kiindulási CFU értékek

A kiindulási szuszpenzió CFU értékének meghatározásához az adott hígítási fokon megszámlolt CFU értéket megszoroztuk a hígítás fokával. Ezt követően kiszámoltuk, hogy mennyit oltottunk be a MIC értékek meghatározásához, amihez a segédlemezen elkészített 240+10 µl hígítást, mint 25x hígítást és a törzsoldatból kivett 10 µl-t, mint 100x hígítást (1 ml-nek a 1/100-ad része), összesen tehát a törzsszuszpenció 2500x hígítását vettük alapul. Eredményeinket a **4. táblázat** szemlélteti.

**4. táblázat** CFU eredmények a MIC értékek meghatározásához: a beoltott koncentráció az eredeti szuszpenzió baktérium- vagy gombakonzentrációjának 2500-ad része

Faj	Szuszpenció CFU/ml	Beoltott CFU/ml
<i>E. coli</i>	$2,5 \times 10^{10}$	$9,9 \times 10^6$
<i>S. aureus</i>	$6 \times 10^9$	$2,4 \times 10^6$
<i>P. aeruginosa</i>	$7,4 \times 10^8$	$3 \times 10^5$
<i>S. enterica</i>	$1,6 \times 10^{10}$	$6,5 \times 10^6$
<i>C. albicans</i>	$5,2 \times 10^8$	$2 \times 10^5$

### 5.2 A tapasztalt MIC értékek

Eredményeink alapján a fertőtlenítőszerről megállapítható MIC értékeket *E. coli*, *S. aureus*, *S. enterica* mind a 8-8 törzse esetén a négyszeres, míg *P. aeruginosa* esetén a négy-nyolcszoros, *C. albicans* esetén a kettő-nyolcszoros hígításban figyeltük meg, amelyet az **5. táblázat** szemléltet. A 37. és a 40. *C. albicans* törzs nem nőtt ki.

**5. táblázat** A vizsgált mikrófafajok MIC értéke

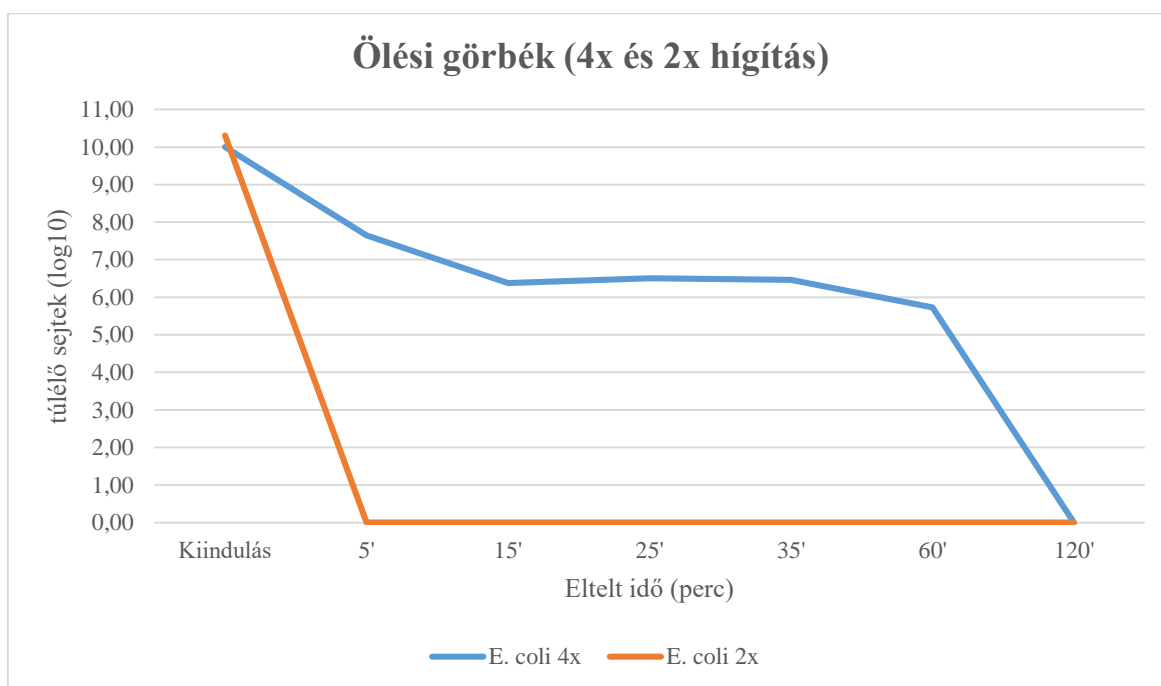
Mikróba faj	Törzsek száma	MIC érték (µg/ml)	Hígítás
<i>E. coli</i>	7 törzs + ATCC™ biofilmtermelő törzs	87,5	4x
<i>S. aureus</i>	7 törzs + ATCC™ biofilmtermelő törzs	87,5	4x
<i>P. aeruginosa</i>	7 törzs + ATCC™ biofilmtermelő törzs	43,75 – 87,5	4-8x
<i>S. enterica</i>	8 törzs	87,5	4x
<i>C. albicans</i>	8 törzs	43,75 – 175	2-8x

### 5.3 Az MBC és MFC meghatározás eredményei

Mivel a Petri-csészékre kikent mintákból egy telep sem nőtt ki, kijelenthetjük, hogy a MIC értékek megegyeznek az MBC és MFC értékekkel (5. táblázat), tehát a fertőtlenítőszer ilyen mértékű hígítása elegendő ahhoz, hogy legalább ezred részére csökkentse a baktériumok, illetve gombák számát, így a hatóanyag mikroba szaporodását gátló koncentrációja minden esetben baktericid/fungicid hatású, el is pusztítja az adott kórokozót, tehát minimális eradikációs koncentrációnak is nevezhetjük.

### 5.4 Ölési görbe meghatározás eredményei

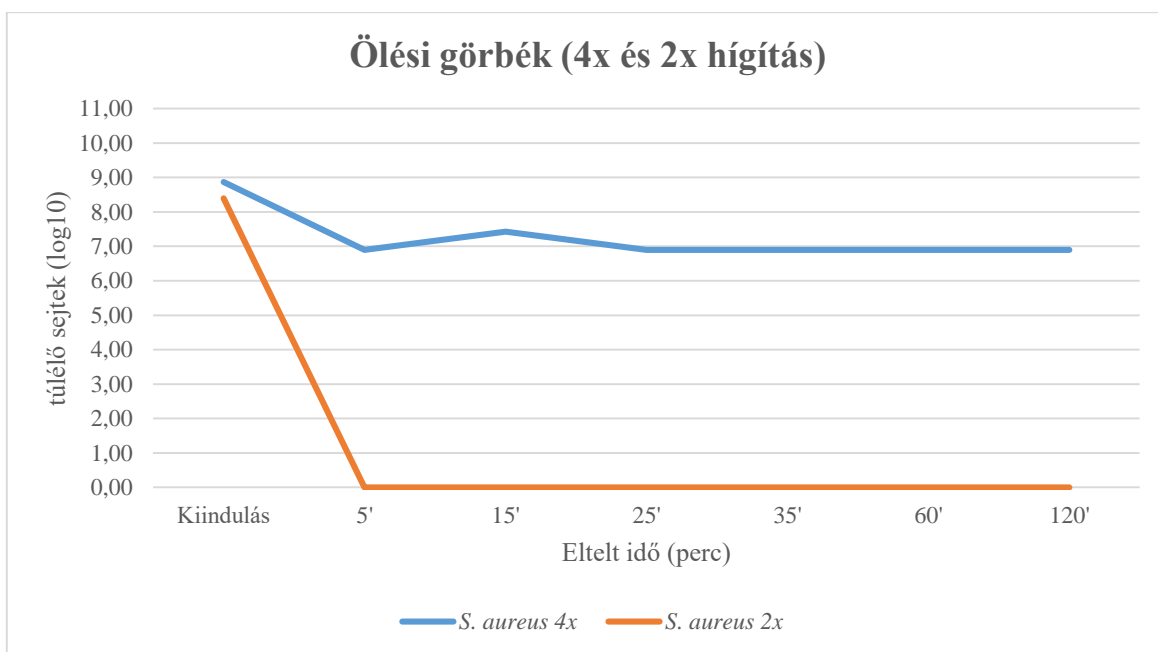
Ehhez a vizsgálathoz újabb kezdeti CFU szám meghatározást végeztünk. Az inkubációt követően minden hígítás esetében megszámloltuk a CFU-t, majd a kapott értékeket meg kellett szorozni a hígítás mértékével.



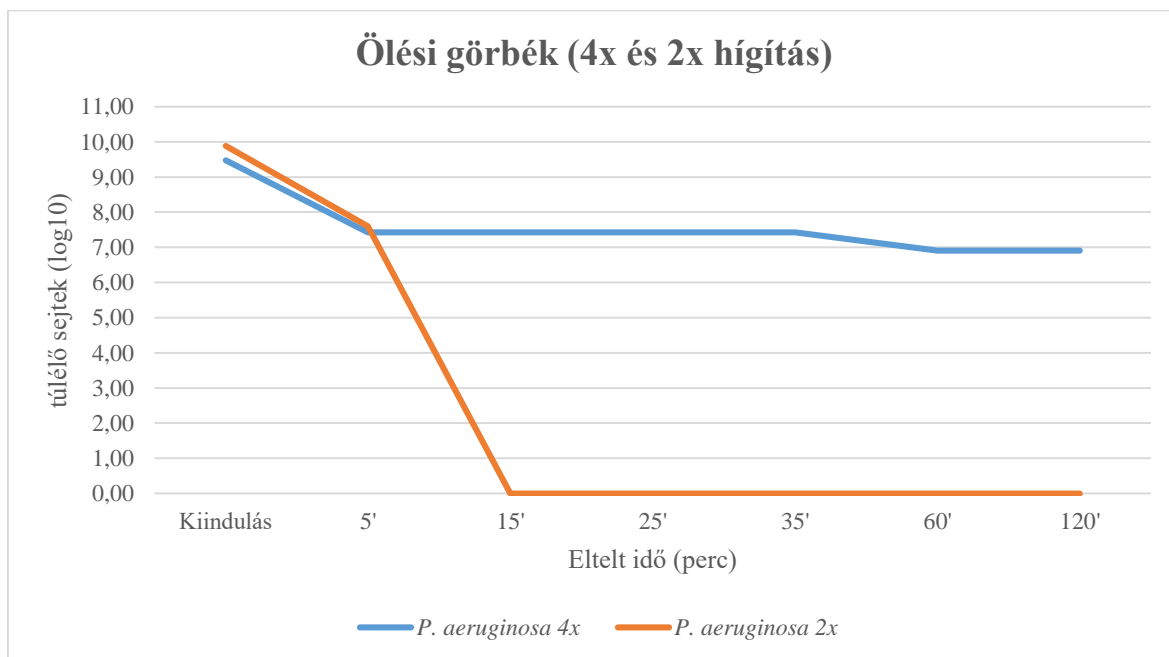
6. ábra *E. coli* törzseken mért ölési görbék a fertőtlenítőszer kezdő koncentrációjának 2x-es és 4x-es hígításának tükrében

Az így kapott értékeket tízes alapú logaritmizálást követően grafikusán ábrázoltuk. A 7. ábrán látható, hogy az *E. coli* esetén a 4x hígításnál 120 percre volt szükség a teljes eradikációhoz, míg a 2x hígítás esetén ehhez 5 perc is elegendő volt. A 8. ábrán megfigyelhető, hogy *S. aureus* esetén a 4x hígítás nem bizonyult hatékonynak, a 2x hígítás viszont 5 perc alatt eliminálta azt. A 9. ábrán látható, hogy *P. aeruginosa* esetén szintén csak a 2x hígítás mutatott kellő hatékonyságot, viszont itt már 15 perc kellett a teljes baktericid hatás kifejtéséhez. A 10. ábrán a *S. enterica*, a 11. ábrán a *C. albicans*

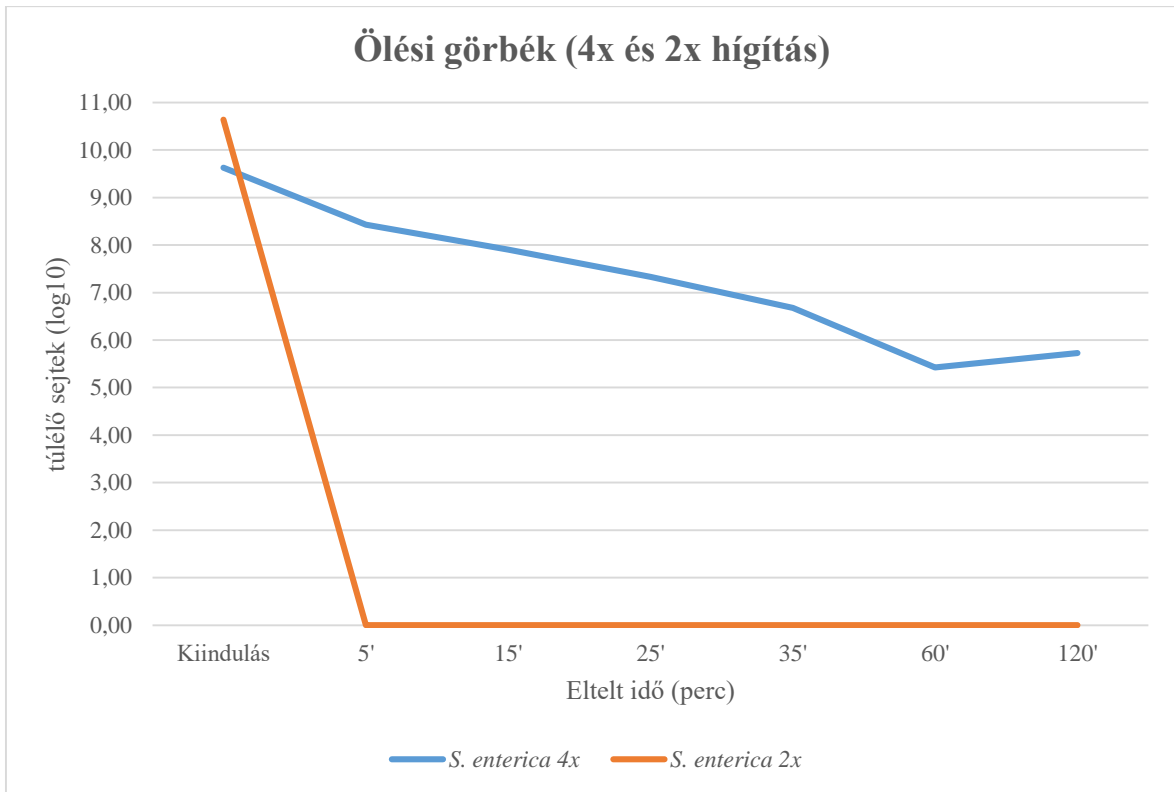
szintén csak 2x hígítás mellett, 5 perc alatt eradikálódott. Összegezve tehát, amikor 4x-es hígítást alkalmaztunk, csupán az *E. coli* esetén, és ott is csak a 120. perc után csökkent jelentős mértékben a CFU. A 2x hígítás során viszont *P. aeruginosa* esetén 15 perc után, az összes többi kórokozó esetén az 5. perc után már teljes eradikáció volt megfigyelhető.



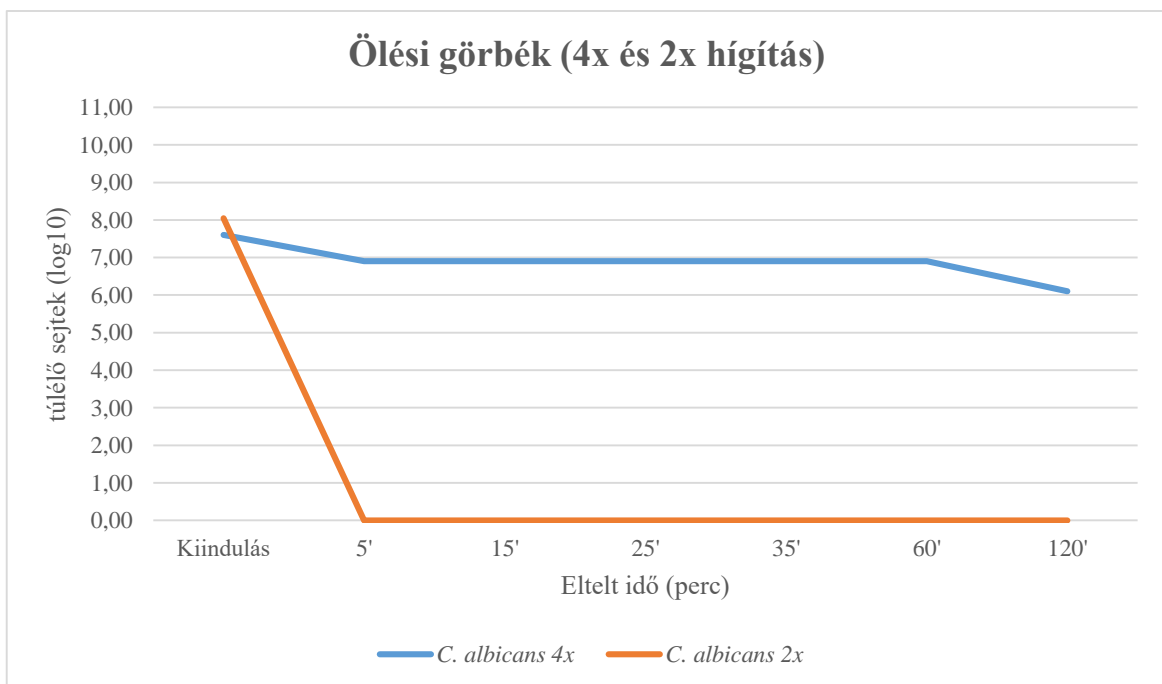
**7. ábra** *S. aureus* törzseken mért ölési görbék a fertőtlenítőszer kezdő koncentrációjának 2x-es és 4-es hígításának tükrében



**8. ábra** *P. aeruginosa* törzseken mért ölési görbék a fertőtlenítőszer kezdő koncentrációjának 2x-es és 4-es hígításának tükrében



**9. ábra** *S. enterica* törzseken mért ölési görbék a fertőtlenítőszer kezdő koncentrációjának 2x-es és 4-es hígításának tükrében



**10. ábra** *C. albicans* törzseken mért ölési görbék a fertőtlenítőszer kezdő koncentrációjának 2x-es és 4-es hígításának tükrében

## 5.5 Biofilmellenes hatás vizsgálatának eredménye

A biofilmbe ágyazott élő baktérium- és gombasejtek mennyiségére az abszorbancia értékekből következtettünk, melyeket a 492 nm-es elnyelési maximumú spektrofotometriás eljárás segítségével állapítottunk meg. A kapott értékeket korrigáltuk, a negatív kontrollok abszorbanciáját levontuk a mért értékből, majd az így kapott abszorbancia értékek segítségével kiszámoltuk a biofilmben lévő életképes mikrobák százalékos csökkenését (**6. táblázat**) a pozitív kontrollokhoz viszonyítva (100%-nak vettük a pozitív kontroll abszorbanciáját), majd megállapítottuk az EC<sub>50</sub> értéket az egyes törzseknél, amely azt a koncentrációját jelöli a vizsgált fertőtlenítőszernek, ahol a biofilmben található életképes mikrobák által spektrofotometriásan mérhető tömege legalább a felére csökkent.

A legtöbb törzs esetében az általunk vizsgált fertőtlenítőszer kétszeres hígítása mutatott hatékony biofilmellenes hatást, ezen hígítás egy törzs kivételével (*S. aureus*) hatékonyan feltörte a képződött biofilmeket. Bizonyos törzsek esetében már a négyszeres és nyolcszoros (*C. albicans*) hígítások is hatékonyak bizonyultak. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a vizsgált fertőtlenítőszer tömény és kétszeres hígításban hatékony biofilmfeltörő tulajdonsággal rendelkezik a vizsgált baktérium- és gombatörzsek esetében.

**6. táblázat** A vizsgált mikroba fajok biofilmjein végzett hatásvizsgálat eredményeinek összesítése a fertőtlenítőszer kezdőkoncentráció hígításának tükrében

Mikróba faj	Törzsek száma	Kezdőkoncentráció hígítás mértéke	Biofilm mikrobaaktivitás százalékos csökkenése
<i>E. coli</i>	7 törzs + ATCC™	2 - 4x	2,16 - 32,28%
<i>S. aureus</i>	7 törzs + ATCC™	tömény – 2x	12,97 – 48,89%
<i>P. aeruginosa</i>	7 törzs + ATCC™	2 – 4x	1,8 – 45,73%
<i>S. enterica</i>	8 törzs	2x	11,82 – 22,99%
<i>C. albicans</i>	8 törzs	2 - 8x	3,51 – 27,29%



## 6 KÖVETKEZTETÉSEK

A telepi menedzsment fontos részét képezi az állatok környezetének rendszeres tisztítása és fertőtlenítése, melynek segítségével csökkenthető a megbetegedéseket okozó patogének száma, megelőzve ezzel egy esetleges járvány kitörését. Az egészséges környezet hozzájárul továbbá az állat megfelelő jóllétének biztosításához, ezáltal a takarmányhasznosítás és termelékenység növekedéséhez [2]. A fertőtlenítés során a kívánt hatás elérése érdekében figyelembe kell vennünk az alkalmazott fertőtlenítőszer tulajdonságait, biztonságosságát, a mikrobaölő hatás eléréséhez szükséges érintkezési idejét, valamint a jelenlévő mikroorganizmusokkal szembeni hatékonyságát [7]. Tanulmányunk során egy aktív HOCl tartalmú fertőtlenítőszer hatékonyságát vizsgáltuk öt – telepi körülmények között is előforduló, állategészségügyi szempontból jelentős – kórokozóval (*E. coli*, *S. aureus*, *S. enterica*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*) szemben. Ehhez meghatároztuk a MIC, az MBC és MFC értékeket, valamint ölési görbéket készítettünk. Vizsgáltuk továbbá a fertőtlenítőszer biofilmfeltörő képességét is.

Eredményeink alapján a vizsgált törzsek MBC és MFC értékei megegyeztek a MIC értékekkel (43,75–175 µg/ml), tehát a fertőtlenítőszer ilyen mértékű hígítása baktericid/fungicid hatású is egyben, nem csupán gátolja a baktériumok és gombák növekedését, de el is pusztítja azokat. Kimutattuk, hogy a készítmény gyártó által garantált 0,35 mg/ml aktív klórtartalma 2x hígítva (175 µg/ml) még hatékonyan gátolta a legtöbb kórokozó növekedését. Az *E. coli*, *S. enterica*, *S. aureus* esetén a 4x hígítások (87,5 µg/ml), *P. aeruginosa* esetén a 4-8x hígítások (43,75–87,5 µg/ml), *C. albicans* esetén pedig 2-8x hígítások (43,75–175 µg/ml) bizonyultak hatékonyak. Ezzel szemben Wang és mtsai. által vizsgált fertőtlenítőszer már 0,1 és 2,8 µg/ml koncentrációban széles spektrumú antimikrobiális hatást mutatott. Az MBC *E. coli* esetén 0,7 µg/ml, *P. aeruginosa* esetén 0,35 µg/ml, *S. aureus* esetén 0,173 µg/ml, *C. albicans* esetén 2,7 µg/ml volt [39]. Sakarya és mtsai. által végzett kísérletben a HOCl oldat MBC-ja 64x hígításnak (3 µg/ml) felelt meg a *P. aeruginosa* esetén, 32x és 64x (3-6 µg/ml) hígítás volt a *S. aureus* és a *C. albicans* esetén [38]. Mazzola és mtsai. NaOCl tartalmú fertőtlenítőszer hatékonyságát vizsgálva azt találták, hogy 9-nél nagyobb pH-jú oldat esetében a MIC érték *S. aureus* esetén 945 µg/ml, *E. coli* esetén 1129 µg/ml volt. Ezzel szemben az oldat pH-ját 7-re csökkentve a HOCl túlsúlya – ezáltal a mikrobaölő hatás növekedése – miatt mindkét baktérium esetén a MIC érték 150 µg/ml -re csökkent [24]. McKenna és mtsai. kimutatták, hogy 50 ppm HOCl az alkalmazását követő 5 percen belül gátolta az *E. coli* törzs sejtosztódásának 100%-t [30].

Az ölési görbe eredményei alapján az általunk vizsgált fertőtlenítőszer 2x hígítása 5 percen belül elpusztította az összes kórokozót, kivétel a *P. aeruginosa*, ahol ennek eléréséhez 15 percre volt szükség (175 µg/ml). A kiindulási törzsoldat 4x hígítása ezzel szemben csupán az *E. coli* esetén rendelkezett baktericid hatással, ott is csak 120 perc után (87,5 µg/ml). Wang és mtsai. kísérletükben azt találták, hogy a fertőtlenítőszer hatására a *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* és *S. aureus* kevesebb, mint 1 perc alatt (0,1-2,8 µg/ml) elpusztultak [39]. Sakarya és mtsai. hasonló eredményt kaptak (3-6 µg/ml), esetükben a HOCl a vizsgált mikrobákat 12 másodpercen belül elölte [38].

Megállapítottuk, hogy a fertőtlenítőszer tömény és kétszeres hígítású oldata a kísérletben vizsgált baktérium- és gombatörzsek esetében hatékony biofilmfeltörő tulajdonsággal rendelkezik. Ennek pontosabb tanulmányozásához további, a teljes biofilm tömeget mérő, vagy a biofilmben foglalt sejtek aktivitásával korreláló festési eljárással történő vizsgálatra, továbbá a biofilmben foglalt mikroba sejtek életképességének kimutatására szolgáló festési eljárások számszerűsített értékei és a biofilmből kinyerhető mikrobák CFU-jának korrelációjának meghatározására van szükség. Sakarya és mtsai. ezzel szemben azt találták, hogy a *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* által termelt biofilm gyengítésére irányuló hatékony dózis a kiindulási koncentráció (218 ppm) 32x és 16x hígítása közt változott [38].

Összességében elmondható, hogy a MIC értékek alapján a fertőtlenítőszer négyszeres hígítás mértékéig mutat kellő hatékonyságot a vizsgált baktérium- és gombatörzsek ellen, ettől azonban jóval nagyobb hígítás esetén is elvárható lenne a mikrobaölő hatás, ezért mindenképpen javasolt a fertőtlenítőszer HOCl tartalmának növelése. Az általunk kapott eredményeket a szakirodalomban talált értékekkel összevetve látható, hogy a vizsgált fertőtlenítőszer az átlagosnál kevésbé bizonyult hatékonynak. Előfordulhat, hogy az inkubálás során a szobahőmérsékletnél magasabb hőfokon csökkent a hatóanyag aktivitása. Az eredményt befolyásolhatta továbbá a vizsgált közeg kémhatásának a kísérlet során bekövetkező esetleges megváltozása is, ezért érdemes lehet a kezdeti pH mérést annak folyamatos monitorozásával kiegészíteni. A korábbi kutatásokat tanulmányozva azonban nem találtunk olyan metodikai különbséget, ami az eltérő eredményeket magyarázná. Annak eldöntése érdekében, hogy a fertőtlenítőszer sikeresen alkalmazhatják-e haszonállattartó telepeken további vizsgálatokra van szükség, melyek pontosan lemodellezik a telepi körülmények fertőtlenítőszer hatását befolyásoló tényezőit.

## 7 ÖSSZEFOGLALÓ

Napjaink egyik legnagyobb jelentőséggel bíró problémája az antimikrobiális rezisztencia terjedése, melynek visszaszorítása érdekében törekedni kell az antibiotikumok használatának csökkentésére, a fertőző betegségek megelőzésére. A prevenció kulcsa a megfelelő higiénia biztosításával a kórokozók elleni hatékony védekezés, melynek egyik legkézenfekvőbb eszköze a fertőtlenítőszer alkalmazása, mely hozzájárul az állattartó telepeken előforduló fertőzések megelőzéséhez, ezáltal a felhasznált antimikrobiális szerek mennyiségének, valamint a kórokozók velük szemben kialakult rezisztenciájának a csökkentéséhez, így a gazdaságon belüli állategészségügyi kiadások is jelentősen mérséklődnek. Ideális fertőtlenítőszer nincs, a gyártók törekednek arra, hogy minél hatékonyabb, a kórokozókkal szemben megfelelő védelmet biztosító, a környezetet és az élőlények egészségét nem károsító készítményt hozzanak létre. Ezeknek az elvárásoknak megfelelő alternatíva lehet a HOCl, amely a kórokozók széles spektruma ellen hatékony. A HOCl fertőtlenítőszerrel kapcsolatos vizsgálatok többségét humán kórokozókon végezték, állatorvosi vonalon a szakirodalom meglehetősen szegényes.

Kutatásunk során Magyarországon először vizsgáltuk aktív HOCl tartalmú fertőtlenítőszernek állati eredetű baktérium törzsek – *S. aureus*, *E. coli*, *S. enterica*, *P. aeruginosa* – és *C. albicans* gomba ellenes *in vitro* hatékonyságát. Kimutattuk, hogy az aktív HOCl tartalmú készítmény gyártó által garantált 0,35 mg/ml aktív klórtartalma 2x hígítva még hatékonyan gátolta a legtöbb kórokozó növekedését, *P. aeruginosa* esetén a 4-8x hígítások, *C. albicans* esetén pedig 2-8x hígítások is hatékonyak bizonyultak. Annak eldöntése érdekében, hogy a fertőtlenítőszer bakteriosztatikus/baktericid és fungisztatikus/fungicid hatással bír, MBC és MFC meghatározást végeztünk.

Eredményeink alapján az MBC és MFC értékek megegyeztek a minimális gátló koncentráció (MIC) értékekkel (43,75-175 µg/ml), tehát a fertőtlenítőszer baktericid/fungicid hatású volt. Az ölési görbe eredményei alapján a fertőtlenítőszer 2x hígítása 5 percen belül teljes mértékben elpusztította az összes kórokozót, kivétel a *P. aeruginosa*, ahol ennek eléréséhez 15 percre volt szükség. Vizsgáltuk a kiindulási törzsoldat 4x hígítását, azonban itt csak az *E. coli* esetében volt baktericid hatás 120 perc után. MTS vitális festéssel megállapítottuk, hogy a fertőtlenítőszer tömény és 2x hígítású oldata hatékony biofilmfeltörő tulajdonsággal rendelkezik. Következtetésképp a MIC értékek és a vele megegyező MBC/MFC értékek alapján megállapítható, hogy a tömény fertőtlenítőszer hatékonysága 4x hígítás mértékéig baktericid/fungicid hatású volt.

## 8 SUMMARY

One of the most significant issues nowadays is the increasing spread of antimicrobial resistance, therefore efforts must be made to slow down this process by reducing the use of antimicrobial agents and putting emphasis on the prevention of infectious diseases. One of the most obvious tools to ensure this is the use of disinfectants to maintain good hygiene, thereby reducing the amount of antimicrobials used on an animal farm, that leads to the decreasing number of antimicrobial-resistant pathogens and significantly reduces on-farm veterinary expenditures. There is no such thing as a perfect disinfectant, but the manufacturers try to create more effective products that can provide maximal protection against pathogens, without damaging the environment or the host. A suitable alternative that can meet these expectations might be HOCl, which is effective against a broad spectrum of pathogens. Most of the studies on HOCl disinfectants have been carried out on human pathogens and the literature regarding to veterinarian field is rather limited.

In our study, we investigated for the first time in Hungary the *in vitro* efficacy of a disinfectant containing active HOCl against bacterial strains of animal origin – *S. aureus*, *E. coli*, *S. enterica*, *P. aeruginosa* – and on *C. albicans* fungi. It was shown that the tested HOCl product, containing active chlorine in 0,35 mg/ml concentration was still effective in inhibiting the growth of most pathogens when diluted 2 times and it was effective against *P. aeruginosa* and *C. albicans* when diluted 4-8x and 2-8x. To determine whether the disinfectant has a bacterio-static/bactericid and fungistatic/fungicid effect, MBC and MFC calculation was performed. According to our results, the MBC/MFC values are equal to the minimum inhibitory concentration (MIC) values (43,75-175 µg/ml), indicating that the disinfectant has bactericidal/fungicidal activity. Based on the results of the kill curve, a 2x dilution of the disinfectant killed all pathogens within 5 minutes, except for *P. aeruginosa*, where 15 minutes were required. A 4x dilution of the original stock-solution was also tested, but it showed bactericidal activity only against *E. coli*, after 120 minutes. It was also found that the concentrated and 2x diluted solution of the disinfectant had effective biofilm-disrupting properties according to MTS staining of the biofilms of the investigated bacteria.

In conclusion, based on the MIC values and the corresponding MBC/MFC values, it can be said that the concentrated disinfectant has a bactericidal/fungicidal effect up to its 4x dilution.

## 9 IRODALOMJEGYZÉK

1. Böhm R (1998) Disinfection and hygiene in the veterinary field and disinfection of animal houses and transport vehicles. *International Biodeterioration & Biodegradation* 41:217–224 . [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00030-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00030-4)
2. Gosling R (2018) A review of cleaning and disinfection studies in farming environments. *Livestock* 23:232–237 . <https://doi.org/10.12968/live.2018.23.5.232>
3. Fotheringham VJ (1995) Disinfection of livestock production premises. *Rev Sci Tech* 14:191–205 . <https://doi.org/10.20506/rst.14.1.833>
4. Egészség- és Fogyasztóügyi Főigazgatóság (Európai Bizottság) (2007) Az Európai Unió új állat-egészségügyi stratégiájáról (2007–2013), melynek alapelve: „jobb megelőzni, mint gyógyítani”. Az Európai Unió Kiadóhivatala, Luxemburg. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/f973db47-5c21-4ea9-82f4-5c9c0b175cbc/language-hu>. Accessed 14 September 2021
5. Pokludová L (2020) Prevention Is Better Than Cure. In: Pokludová L (ed) *Antimicrobials in Livestock 1: Regulation, Science, Practice: A European Perspective*. Springer International Publishing, Cham, pp 125–165
6. Block MS, Rowan BG (2020) Hypochlorous Acid: A Review. *J Oral Maxillofac Surg* 78:1461–1466 . <https://doi.org/10.1016/j.joms.2020.06.029>
7. Rutala WA, Weber DJ (2014) Selection of the ideal disinfectant. *Infect Control Hosp Epidemiol* 35:855–865 . <https://doi.org/10.1086/676877>
8. Grooms D (2003) *Biosecurity Guide for Livestock Farm Visits*. Michigan State University Extension Bulletin, E-2842
9. Amass SF (2004) Diagnosing disinfectant efficacy. *Journal of Swine Health and Production* 12:82–83
10. Price AB (2019) Evaluation of a Revised Protocol for Stall Terminations in the Large Animal Hospital. Virginia Polytechnic Institute and State University
11. McLaren I, Wales A, Breslin M, Davies R (2011) Evaluation of commonly-used farm disinfectants in wet and dry models of *Salmonella* farm contamination. *Avian Pathology* 40:33–42 . <https://doi.org/10.1080/03079457.2010.537303>
12. Dvorak G (2008) *Disinfection 101*. Ames, IA: Center for Food Security and Public Health, Iowa State University. <https://www.cfsph.iastate.edu/Disinfection/Assets/Disinfection101.pdf>. Accessed 30 September 2021
13. Buffet-Bataillon S, Tattevin P, Bonnaure-Mallet M, Jolivet-Gougeon A (2012) Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds—a critical review. *International Journal of Antimicrobial Agents* 39:381–389 . <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.01.011>
14. Denyer SP, Stewart GSAB (1998) Mechanisms of action of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation* 41:261–268 . [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00023-7)
15. Melin VE, Melin TE, Dessify BJ, Nguyen CT, Shea CS, Hrubec TC (2016) Quaternary ammonium disinfectants cause subfertility in mice by targeting both male and female reproductive processes. *Reprod Toxicol* 59:159–166 . <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.10.006>
16. McDonnell G (2014) The Use of Hydrogen Peroxide for Disinfection and Sterilization Applications. In: *PATAI'S Chemistry of Functional Groups*. American Cancer Society, pp 1–34
17. Rutala WA, Weber DJ (2013) Disinfectants used for environmental disinfection and new room decontamination technology. *Am J Infect Control* 41:S36–41 . <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2012.11.006>
18. Capriotti K, Capriotti JA (2012) Topical iodophor preparations: chemistry, microbiology, and clinical utility. *Dermatol Online J* 18:1
19. Bek TJ, Griffin D, Kennedy J (2000) G1410 Selection and Use of Disinfectants. *Historical Materials from University of Nebraska-Lincoln Extension*
20. Makhayeva DN, Irmukhametova GS, Khutoryanskiy VV (2020) Polymeric Iodophors: Preparation, Properties, and Biomedical Applications. *Ref J Chem* 10:40–57 . <https://doi.org/10.1134/S2079978020010033>
21. da Cruz Nizer WS, Inkovskiy V, Overhage J (2020) Surviving Reactive Chlorine Stress: Responses of Gram-Negative Bacteria to Hypochlorous Acid. *Microorganisms* 8:E1220 . <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081220>

22. Wang G-S, Deng Y-C, Lin T-F (2007) Cancer risk assessment from trihalomethanes in drinking water. *Sci Total Environ* 387:86–95 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.07.029>
23. Ono T, Yamashita K, Murayama T, Sato T (2012) Microbicidal effect of weak acid hypochlorous solution on various microorganisms. *Biocontrol Sci* 17:129–133 . <https://doi.org/10.4265/bio.17.129>
24. Mazzola P, Jozala A, de Lencastre Novaes L, Moriel P, Christina T, Penna V (2009) Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 45:241–248 . <https://doi.org/10.1590/S1984-82502009000200008>
25. Ishihara M, Murakami K, Fukuda K, Nakamura S, Kuwabara M, Hattori H, Fujita M, Kiyosawa T, Yokoe H (2017) Stability of Weakly Acidic Hypochlorous Acid Solution with Microbicidal Activity. *Biocontrol Sci* 22:223–227 . <https://doi.org/10.4265/bio.22.223>
26. Slaughter RJ, Watts M, Vale JA, Grieve JR, Schep LJ (2019) The clinical toxicology of sodium hypochlorite. *Clin Toxicol (Phila)* 57:303–311 . <https://doi.org/10.1080/15563650.2018.1543889>
27. Chen C-J, Chen C-C, Ding S-J (2016) Effectiveness of Hypochlorous Acid to Reduce the Biofilms on Titanium Alloy Surfaces in Vitro. *International Journal of Molecular Sciences* 17:1161 . <https://doi.org/10.3390/ijms17071161>
28. Fukuzaki S (2006) Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Sci* 11:147–157 . <https://doi.org/10.4265/bio.11.147>
29. Bajgai J, Kim C-S, Rahman M, Fadriqela A, Thuy T, Lee K-J (2020) Application of New Concept Disinfectant, Huureka®, On Livestock Farming Application of New Concept Disinfectant, Huureka®, On Livestock Farming
30. McKenna SM, Davies KJ (1988) The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. Possible role in the bactericidal activity of phagocytes. *Biochem J* 254:685–692 . <https://doi.org/10.1042/bj2540685>
31. Sultana S, Foti A, Dahl J-U (2020) Bacterial Defense Systems against the Neutrophilic Oxidant Hypochlorous Acid. *Infect Immun* 88:e00964-19 . <https://doi.org/10.1128/IAI.00964-19>
32. Winterbourn CC, Kettle AJ (2000) Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine* 29:403–409 . [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00204-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00204-5)
33. Mütze S, Hebling U, Stremmel W, Wang J, Arnhold J, Pantopoulos K, Mueller S (2003) Myeloperoxidase-derived Hypochlorous Acid Antagonizes the Oxidative Stress-mediated Activation of Iron Regulatory Protein 1 \*. *Journal of Biological Chemistry* 278:40542–40549 . <https://doi.org/10.1074/jbc.M307159200>
34. Lapenna D, Cuccurullo F (1996) Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: an update picture. *Gen Pharmacol* 27:1145–1147 . [https://doi.org/10.1016/s0306-3623\(96\)00063-8](https://doi.org/10.1016/s0306-3623(96)00063-8)
35. Rahman M (2019) Characteristics and Anti-bacterial Effects of Mineral Supplement-Hypochlorous Acid Water on Human Pathogenic Bacteria. 44–55
36. Mourad KA, Hobro S (2020) Developing chlorine-based antiseptic by electrolysis. *Science of The Total Environment* 709:136108 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136108>
37. Çetin H, Erdoğan G, Uçar EH, Peker C, Sakarya S (2018) Investigation of intramammary hypochlorous administration in cattles with subclinical mastitis. In: *Mediterranean Veterinary Congress coupled with 7th REEV-Med General Assembly*, 13-14 December, 2018, Kirikkale University, Turkey, p 122
38. Sakarya S, Gunay N, Karakulak M, Ozturk B, Ertugrul B (2014) Hypochlorous Acid: an ideal wound care agent with powerful microbicidal, antibiofilm, and wound healing potency. *Wounds* 26:342–350
39. Wang L, Bassiri M, Najafi R, Najafi K, Yang J, Khosrovi B, Hwong W, Barati E, Belisle B, Celeri C, Robson MC (2007) Hypochlorous acid as a potential wound care agent: part I. Stabilized hypochlorous acid: a component of the inorganic armamentarium of innate immunity. *J Burns Wounds* 6:e5
40. Hawkins CL, Davies MJ (2002) Hypochlorite-induced damage to DNA, RNA, and polynucleotides: formation of chloramines and nitrogen-centered radicals. *Chem Res Toxicol* 15:83–92 . <https://doi.org/10.1021/tx015548d>
41. Spickett CM, Jerlich A, Panasencko OM, Arnhold J, Pitt AR, Stelmaszyńska T, Schaur RJ (2000) The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. *Acta Biochim Pol* 47:889–899
42. Rossi-Fedele G, Dogramaci EJ, Steier L, de Figueiredo J a. P (2011) Some factors influencing the stability of Sterilox®, a super-oxidised water. *Br Dent J* 210:E23 . <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2011.143>

43. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C (2013) *Escherichia coli* in Europe: an overview. *Int J Environ Res Public Health* 10:6235–6254 . <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
44. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2:123–140 . <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
45. Varga J, Rusvai M, Fodor L (2018) Enterobacteriumok okozta betegségek. In: A háziállatok fertőző betegségei. MÁOK Kft., Budapest, pp 117–130
46. Adorján A, Makrai L, Könyes L, Tóth I (2021) Enteropatogén *Escherichia coli* (EPEC). *Magyar Állatorvosok Lapja* 143:429–438
47. Burvenich C, Merris VV, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L (2003) Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res* 34:521–564 . <https://doi.org/10.1051/vetres:2003023>
48. Varga J, Rusvai M, Fodor L (2018) Staphylococcusok okozta betegségek. In: A háziállatok fertőző betegségei. MÁOK Kft., Budapest, pp 67–73
49. Geng H, Zou W, Zhang M, Xu L, Liu F, Li X, Wang L, Xu Y (2020) Evaluation of phage therapy in the treatment of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *Folia Microbiol* 65:339–351 . <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00729-9>
50. Kovács P, Tibold J, Ózsvári L (2015) A *Staphylococcus aureus* tögygyulladás elleni védekezés egy nagyüzemi holstein-fríz állományban és a fertőzés gazdasági hatásai. *Magyar Állatorvosok Lapja* 137:707–718
51. Tam K, Torres VJ (2019) *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiology Spectrum* 7:7.2.16 . <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018>
52. Misra N, Wines TF, Knopp CL, Hermann R, Bond L, Mitchell B, McGuire MA, Tinker JK (2018) Immunogenicity of a *Staphylococcus aureus*-cholera toxin A2/B vaccine for bovine mastitis. *Vaccine* 36:3513–3521 . <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.04.067>
53. Tremblay YDN, Caron V, Blondeau A, Messier S, Jacques M (2014) Biofilm formation by coagulase-negative staphylococci: impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms. *Vet Microbiol* 172:511–518 . <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.007>
54. David MZ, Daum RS (2017) Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections. In: Bagnoli F, Rappuoli R, Grandi G (eds) *Staphylococcus aureus: Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis*. Springer International Publishing, Cham, pp 325–383
55. Andino A, Hanning I (2015) *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars. *ScientificWorldJournal* 2015:520179 . <https://doi.org/10.1155/2015/520179>
56. Wagner C, Hensel M (2011) Adhesive Mechanisms of *Salmonella enterica*. In: Linke D, Goldman A (eds) *Bacterial Adhesion: Chemistry, Biology and Physics*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 17–34
57. Mannion C, Leonard FC, Lynch PB, Egan J (2007) Efficacy of cleaning and disinfection on pig farms in Ireland. *Vet Rec* 161:371–375 . <https://doi.org/10.1136/vr.161.11.371>
58. Baloda SB, Christensen L, Trajcevska S (2001) Persistence of a *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT12 clone in a piggery and in agricultural soil amended with *Salmonella*-contaminated slurry. *Appl Environ Microbiol* 67:2859–2862 . <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2859-2862.2001>
59. Berends BR, Van Knapen F, Mossel DA, Burt SA, Sniijders JM (1998) Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. *Int J Food Microbiol* 44:219–229 . [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(98\)00121-4](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(98)00121-4)
60. Varga J, Rusvai M, Fodor L (2018) Salmonellák okozta betegségek. In: A háziállatok fertőző betegségei. MÁOK Kft., Budapest, pp 130–150
61. de Bentzmann S, Plésiat P (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environ Microbiol* 13:1655–1665 . <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02469.x>
62. Milivojevic D, Šumonja N, Medic S, Pavic A, Moric I, Vasiljevic B, Senerovic L, Nikodinovic-Runic J (2018) Biofilm-forming ability and infection potential of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from animals and humans. *Pathog Dis* 76: . <https://doi.org/10.1093/femspd/fty041>
63. de Melo ACC, da Mata Gomes A, Melo FL, Ardisson-Araújo DMP, de Vargas APC, Ely VL, Kitajima EW, Ribeiro BM, Wolff JLC (2019) Characterization of a bacteriophage with broad host range against strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from domestic animals. *BMC Microbiol* 19:134 . <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1481-z>

64. Breidenstein EBM, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW (2011) *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* 19:419–426 . <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>
65. Lee K, Yoon SS (2017) *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J Microbiol Biotechnol* 27:1053–1064 . <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11056>
66. Gácsér A (2016) Opportunista humánpatogén gombák virulenciájának és patogenitásának komplex vizsgálata. Szegedi Tudományegyetem
67. Martins N, Ferreira ICFR, Barros L, Silva S, Henriques M (2014) Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. *Mycopathologia* 177:223–240 . <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9749-1>
68. Medveczky I, Rusvai M, Varga J, Tuboly S (1998) Állatorvosi Járványtan I. - Állatorvosi Mikrobiológia, Bakteriológia, Viroológia, Immunológia. Mezőgazda Kiadó, Budapest
69. Rhimi W, Aneke CI, Annoscia G, Camarda A, Mosca A, Cantacessi C, Otranto D, Cafarchia C (2021) Virulence and in vitro antifungal susceptibility of *Candida albicans* and *Candida catenulata* from laying hens. *Int Microbiol* 24:57–63 . <https://doi.org/10.1007/s10123-020-00141-1>
70. Lorin D, Teuşdea V, Mitrănescu E, Daneş M, Ştef L, Moşneang CL, Cristina RT (2017) The mycobiota composition in eight Romanian representative poultry and swine farms. *Romanian Biotechnological Letters* 22:11
71. Zmuda HM, Mohamed A, Raval YS, Call DR, Schuetz AN, Patel R, Beyenal H (2020) Hypochlorous acid-generating electrochemical scaffold eliminates *Candida albicans* biofilms. *J Appl Microbiol* 129:776–786 . <https://doi.org/10.1111/jam.14656>
72. Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA (2016) Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and Disease* 74: . <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw018>
73. Eldesouky I, Nayel M, Khalaf D, Salama A, Elsify A, Ombarak R, Elballal S, Effat M, Shabrawy M (2016) *Candida* Mastitis in Dairy Cattle with Molecular Detection of *Candida albicans*. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* 22:461–464 . <https://doi.org/10.9775/kvfd.2015.14843>
74. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V (2018) Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence* 9:522–554 . <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>
75. Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T (2020) Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends Microbiol* 28:668–681 . <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>
76. Crouzet M, Le Senechal C, Brözel VS, Costaglioli P, Barthe C, Bonneu M, Garbay B, Vilain S (2014) Exploring early steps in biofilm formation: set-up of an experimental system for molecular studies. *BMC Microbiology* 14:253 . <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0253-z>
77. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35:322–332 . <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011>
78. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, Hussain T, Ali M, Rafiq M, Kamil MA (2018) Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc* 81:7–11 . <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
79. Brilhante RSN, Rocha MG da, Guedes GM de M, Oliveira JS de, Araújo G dos S, España JDA, Sales JA, Aguiar L de, Paiva M de AN, Cordeiro R de A, Pereira-Neto W de A, Pinheiro A de Q, Sidrim JJC, Castelo-Branco D de SCM, Rocha MFG (2018) *Malassezia pachydermatis* from animals: Planktonic and biofilm antifungal susceptibility and its virulence arsenal. *Veterinary Microbiology* 220:47–52 . <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.05.003>
80. Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Presterl E (2012) Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses* 55:199–204 . <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02076.x>
81. Pihl M, Chávez de Paz LE, Schmidtchen A, Svensäter G, Davies JR (2010) Effects of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* on *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 59:504–512 . <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00707.x>
82. Gomes F, Saavedra MJ, Henriques M (2016) Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. *Pathogens and Disease* 74: . <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw006>
83. Pratiwi SU, Legendijk E, Weert SD, Hertiani T, Idroes R, Hondel CVD (2015) Effect of *Cinnamomum burmannii* Nees ex Bl. and *Massoia aromatica* Becc. Essential Oils on Planktonic Growth and Biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* In Vitro. undefined



## 10 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Kerek Ádámnak és Dr. Veres Adrienn Mercédesznek fáradhatatlan munkájukért, valamint a kutatás és a dolgozat megírása alatt nyújtott rengeteg segítségért, jó tanácsért és szakmai útmutatásért, mellyel lehetővé tették ezen dolgozat létrejöttét. Köszönettel tartozom Dr. Jerzsele Ákosnak, a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék vezetőjének, hogy lehetőségem nyílt bekapcsolódni a kutatásba, valamint, hogy mindvégig ellenőrizte és figyelemmel követte munkánkat.

Szeretném megköszönni az Állatorvostudományi Egyetem Gyógyszertani és Méregtani Tanszék dolgozóinak, hogy a kísérletekhez helyet és eszközöket biztosítottak, hozzájárulva ezzel a gördülékeny munkához.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom családomnak, páromnak, barátaimnak és kiskutyámnak, akik az elmúlt évekhez hasonlóan a dolgozatírás ideje alatt is türelmükkel, támogatásukkal és szeretetükkel segítették a munkámat.

**HuVetA**  
**ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT\***

**Név:** Bencsik Luca

**Elérhetőség (e-mail cím):** luca.bencsik@gmail.com

**A feltöltendő mű címe:** Aktív HOCl tartalmú fertőtlenítő antimikrobiális és biofilmellenes hatása

**A mű megjelenési adatai:** Diplomamunka 2022

**Az átadott fájlok száma:** 1 db

---

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédt PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (**egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel**):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**

Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörő módon visszaélne.

Budapest, 2022. november 08.

*Bencsik Luca*

aláírás  
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

---

*A **HuVetA** Magyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.*

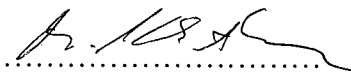
*A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén*

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*

## Témavezetői nyilatkozat

Alulírott **Dr. Kerek Ádám**, mint témavezető nyilatkozom, hogy **Bencsik Luca** állatorvostan-hallgató „**Aktív HOCl tartalmú fertőtlenítő antimikrobiális és biofilmellenes hatása**” c. dolgozata részt vehet az Állatorvostudományi Egyetem 2021. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján.

Budapest, 2021. október 18.



Dr. Kerek Ádám  
témavezető

## NYILATKOZAT

Alulírott **Bencsik Luca** nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe **Aktív HOCl tartalmú fertőtlenítő antimikrobiális és biofilmellenes** hatása tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a **2021.** évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2022. 11. 08.

*Bencsik Luca*

.....

a hallgató neve és aláírása



**Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére**

A hallgató neve: **Bencsik Luca**.....

Neptun-kódja: **EHKKMZ**.....

A témavezető neve és beosztása: **Dr. Veres Adrienn Mercédesz, egyetemi tanársegéd; Dr. Kerek Ádám, tanszéki állatorvos, PhD-hallgató** .....

Tanszék: **Gyógyszertani és Méregtani Tanszék**.....

A diplomadolgozat címe: **Aktív HOCl tartalmú fertőtlenítő antimikrobiális és biofilmellenes hatása**.....

**Konzultáció - 1. félév**

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2021.	04.	07.	A téma megvitatása, a kísérletek időpontjainak megbeszélése	
2.	2021.	04.	21.	Előhívezeteli a kísérletek, annak elvégzéséhez a hűtőszekrény megbeszélése	
3.	2021.	05.	06.	Az első kísérletek anyag és módszer tanárai albeszélése	
4.	2021.	05.	18.	A kísérletek eredményeinek kiértékelése, megatárgyalása	
5.	2021.	06.	08.	A formások megbeszélése, tudományos cikkkel kapcsolatos megbeszélés	

Érdemjegy az első félév végén: ..... **jeles (5)** .....

**Konzultáció - 2. félév**

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2021.	09.	07.	A tudományos cikkek megvitatása, azokkal készült összefoglalók értékelése	
2.	2021.	09.	22.	Inodalmi áttekintés, célkitűzés, anyag és módszer tan megvitatása, javítása	
3.	2021.	10.	05.	Eredményei, megbeszélés, összefoglalás elkészítése, megvitatása, megértekezés	
4.	2021.	10.	15.	A dolgozat albeszélése, utolsó javítások, kiegészítések a leadás előtt	
5.	2021.	11.	10.	Felkészülés a TDK előadásra, pótdolgozat előadás, lehetséges kérdések megvitatása	

Érdemjegy a második félév végén: ..... **jeles (5)** .....

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!



A diplomamunka - a szakra vonatkozóan - a Tanulmányi- és Vizsgaszabályzatban, valamint az Útmutató a szakdolgozatok/diplomamunkák készítéséhez című mellékletében leírt követelményeknek megfelel.

A diplomamunka befogadható, védeésre alkalmasnak találtam.

témavezető aláírása

Hallgató aláírása: Bencsik Luca

Tanszéki előadó aláírása: M. N. U. Átvétel dátuma: 2022.06.24.