

Állatorvostudományi Egyetem
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

**Juhokból izolált *Pasteurella multocida* törzsek
antibiotikum érzékenységi vizsgálata**

**Antibiotic susceptibility testing of *Pasteurella multocida*
strains, isolated from sheep**

Készítette: Körömi István Lajos

Témavezető: Dr. Tóth Gergely, egyetemi tanársegéd

Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

2023

1 Absztrakt

A *Pasteurella multocida* egy széles gazdaspektrumú baktérium, amely gyakran klinikailag tünetmentes állatok nyálkahártyáin is előfordul. Leggyakrabban a légzőszervek megbetegedését okozza, amely komoly veszteségeket okoz a juh-állományokban világszerte. A betegség kezelésére antibiotikumokat szoktak alkalmazni, azonban az antibiotikumokkal szemben előforduló rezisztencia miatt fontos felmérni különböző országokban, régiókban, állat-állományokban előforduló törzsek antibiotikum-rezisztencia helyzetét. A jelen dolgozatban 25 db *P. multocida* törzs antibiotikum-érzékenységét határoztuk meg korongdiffúziós és leves-mikrohígítási módszerrel is, melyek mind magyarországi juhok légzőszervi mintáiból lettek izolálva. A vizsgálatokhoz a következő antibiotikumokat használtuk: oxitetraciklin, enrofloxacin, penicillin, amoxicillin, ceftiofur, florfenikol, gentamicin, szulfametoxazol+trimetoprim, tiamulin, tilmikozin, tulatromicin. Ezen antibiotikumokat más hasonló tanulmányokban is vizsgálták világszerte, és velük szemben előfordult rezisztencia a világ különböző helyeiről, juhok légzőszervi megbetegedéseiből izolált *P. multocida* törzsekben. A mi vizsgálatunkban a MIC (Minimum inhibitory concentration = Minimális gátló koncentráció) értékek alapján oxitetraciklint és florfenikolt kivéve mindegyik antibiotikumnál előfordult rezisztencia vagy közepes érzékenység. Rezisztencia a legnagyobb mértékben szulfametoxazol+trimetoprim-nál (10 törzsben), amoxicillinnél (9 törzsben) és tiamulinnál (7 törzsben) fordult elő. A korongdiffúziós próba eredménye ettől eltért, az csupán szulfametoxazol+trimetoprim esetén- (7 törzsben) és penicillinnél (2 törzsben) mutatott rezisztenciát. Ugyan a tiamulint kivéve minden antibiotikumnál az érzékeny törzsek voltak többségben, a rezisztens és közepesen érzékeny törzsek aránya mégsem volt elhanyagolható. Így az antimikrobiális rezisztencia ismerete az in vitro eredményeink alapján különösen fontos a hatékony antibiotikum kiválasztásában a fertőzés kezelésére.

Abstract

Pasteurella multocida is a bacterium with a broad host range that often occurs on the mucous membranes of clinically asymptomatic animals. Most often it causes disease of the respiratory organs, with consequential serious losses in sheep flocks worldwide. Antibiotics are usually used to treat the disease, however, due to the resistance to antibiotics, it is important to assess the antibiotic resistance situation of strains found in different countries, regions, and animal herds. In the present thesis, we determined the antibiotic sensitivity of 25 *P. multocida* strains using the disk diffusion and broth microdilution methods, all of which were isolated from respiratory samples of sheep in Hungary. The following antibiotics were used for the tests: oxytetracycline, enrofloxacin, penicillin, amoxicillin, ceftiofur, florfenicol, gentamicin, sulfamethoxazole+trimethoprim, tiamulin, tilmicosin, tulathromycin. These antibiotics have been tested in other similar studies worldwide, and resistance to them has occurred in *P. multocida* strains isolated from respiratory diseases in sheep from different parts of the world. In our study, based on the MIC (Minimum inhibitory concentration) values, resistance or moderate sensitivity occurred against all antibiotics except oxytetracycline and florfenicol. Resistance occurred to the highest extent with sulfamethoxazole+trimethoprim (in 10 strains), amoxicillin (9 strains) and tiamulin (7 strains). The results of the disc diffusion test differed from this, showing resistance only in the case of sulfamethoxazole+trimethoprim (in 7 strains) and penicillin (in 2 strains). Although sensitive strains were in the majority for all antibiotics except tiamulin, the proportion of resistant and moderately sensitive strains was still not negligible. Therefore, knowledge of antimicrobial resistance based on our in vitro results is particularly important in choosing an effective antibiotic to treat the infection.

2 Tartalom

1	Absztrakt	2
2	Tartalom	4
3	Rövidítések jegyzéke.....	6
4	Bevezetés.....	9
5	Szakirodalmi áttekintés	11
5.1	A <i>Pasteurella multocida</i> tulajdonságainak jellemzése.....	11
5.1.1	Morfológia.....	11
5.1.2	Tenyésztés	11
5.1.3	Biokémiai tulajdonságok.....	11
5.1.4	Ellenálló képesség.....	12
5.1.5	Antigénszerkezet	12
5.1.6	Patogenitás.....	12
5.1.7	Megelőzés, védekezés, kezelés.....	13
5.2	A választott antibiotikumok jellemzése:	15
5.2.1	Oxitetraciklin:.....	15
5.2.2	Enrofloxacin	15
5.2.3	Penicillin.....	16
5.2.4	Amoxicillin.....	16
5.2.5	Ceftiofur	16
5.2.6	Florfenikol	17
5.2.7	Gentamicin	17
5.2.8	Szulfametoxazol+Trimetoprim.....	17
5.2.9	Tiamulin	18
5.2.10	Tilmikozin	19
5.2.11	Tulatromicin	19
5.3	Az antimikrobiális rezisztencia előfordulása a világ különböző részein élő juh állományokban	20
5.4	Az antimikrobiális rezisztencia gének terjedése a Pasteurellaceae családban:	26
5.4.1	A baktériumok közötti géntranszfer formái:	26
5.4.2	makrolidokkal szembeni rezisztencia:.....	26
5.4.3	tetraciklinekkel szembeni rezisztencia:	27
5.4.4	β -laktámokkal szembeni rezisztencia:.....	28
5.4.5	Az ICEPmu1, egy multirezisztenciát biztosító integratív és konjugatív elem <i>P. multocida</i> -ban:.....	31

5.4.6	A juhokból izolált <i>P. multocida</i> törzsek antibiotikum rezisztencia génjeiről szóló tanulmányok.....	32
6	Célkitűzések/kérdések.....	33
7	Anyag és módszer	34
7.1.1	A vizsgált anyag.....	34
7.1.2	Korongdiffúziós módszer.....	36
7.1.3	A MIC- érték meghatározása leves-mikrohígítással:	38
7.1.4	Az eredmények validálása.....	41
8	Eredmények.....	42
9	Megbeszélés/következtetések.....	55
10	Összefoglalás.....	58
11	Irodalomjegyzék/bibliográfia	59
12	Köszönetnyilvánítás	63

3 Rövidítések jegyzéke

ÁDI: Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság

AMC: amoxicillin/klavulánsav

AMEG: Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group = Antimikrobiális Tanácsadó Ad Hoc Szakértői Csoport

AMP: ampicillin

AMX: amoxicillin

BRDC: Bovine respiratory disease complex = A szarvasmarhák légzőszervi betegségkomplexe

CARD: Comprehensive Antibiotic Resistance Database = átfogó antibiotikum rezisztencia adatbázis

CEF: ceftiofur

CFU: Colony-forming unit = telepformáló egység

CHL: klóramfenikol

CLI: klindamicin

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CTET: klórtetraciklin

DANO: danofloxacin

DNS: dezoxiribonukleinsav

DOX: doxiciklin

dsDNS: kettős szálú DNS

E. coli: *Escherichia coli*

ECOFF: Epidemiological cut-off value = Járványtani határérték

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay = enzimkapcsolt immunszorbens vizsgálat

ENR: enrofloxacin

E-teszt: Epsilon teszt

FFN: florfenikol

GEN: gentamicin

GI : Genomic Island = genomi sziget

H. influenzae: Haemophilus influenzae

H. somni: Histophilus somni

ICE: Integrative and Conjugative Elements = integratív és konjugatív elemek

M. haemolytica: Mannheimia haemolytica

MH: Mueller-Hinton

MIC: Minimum inhibitory concentration = Minimális gátló koncentráció

ml: milliliter

NAL: nalidixinsav

NEO: neomicin

OF teszt: oxidative-fermentative test = oxidációs-fermentációs teszt

ORDC: Ovine respiratory disease complex = A juhok légzőszervi betegségkomplexe

OXY: oxitetraciklin

P. multocida: Pasteurella multocida

PEN: penicillin

RESAPATH: réseau de surveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales = the French network for surveillance of antimicrobial resistance (AMR) in bacterial pathogens isolated from diseased animals = a beteg állatokból izolált bakteriális kórokozók antimikrobiális rezisztenciáját (AMR) felügyelő francia hálózat

rRNS: riboszomális RNS

SDM: szulfadimetoxin

SFL: szulfametoxazol

SPE: spektinomycin

STR: sztreptomycin

SXT: szulfametoxazol+trimetoprim

tet- gén: tetraciklin rezisztenciáért felelős gén

TET: tetraciklin

TIA: tiamulin

TIL: tilmikozin

tRNS: transzfer RNS

TSE: Transmissible spongiform encephalopathy = fertőző szivacsos encephalopathiák

TUL: tulatromicin

TYLT: tylosintartarát

VAN: vankomicin

µg: mikrogramm

µl: mikroliter

4 Bevezetés

Ebben a dolgozatban *Pasteurella multocida* törzsek antibiotikum érzékenységét vizsgáltuk, melyek juhok légzőszervi mintáiból származtak. Valamennyi törzs magyarországi juhokból, az elmúlt 9 évből származott. Korongdiffúziós és leveshígítós módszereket alkalmaztunk az antibiotikum érzékenység meghatározására.

A *P. multocida* a Pasteurellaceae családba tartozik, a *Pasteurella* nemzetségbe, a *Mannheimia* és *Bibersteinia* nemzetségekkel együtt, melyek korábban szintén a *Pasteurella* nemzetségbe tartoztak[1]. Ezek a baktériumok a nyálkahártyákon fordulnak elő, leginkább a felső légutak valamint a szájüreg nyálkahártyáin, gyakran klinikai tüneteket nem mutató emlősökben és madarakban [1, 2]. A pasteurellák okozta megbetegedést összefoglaló néven pasteurellosisnak nevezzük, ami leggyakrabban a légzőszerveket érinti, illetve septicaemiát is okozhat, de ritkábban egyéb szervek megbetegedésével is járhat[1]. Míg a *Mannheimia haemolytica* és a *Bibersteinia trehalosi* csak kérődzőket betegít meg, a *P. multocida* számos más emlős állatfajt is megbetegít, ezen kívül baromfiban a baromfikolerát okozza (főleg lúdban, kacsában, pulykában)[1–3]. A *P. multocida* zoonotikus is, amennyiben például kutya, macska harapása, karmolása során a sebbe kerül, ekkor képes sebfertőzést okozni[1, 4].

A pasteurellák okozta légúti betegségek csökkent teljesítményt, növekvő mortalitást okoznak, a kezelés is pénzbe kerül és ez a termelési költségek növekedését, és nagy anyagi veszteséget okoz a juhokban világszerte[4–7]. Amennyiben a kórokozó rezisztens az antimikrobiális szerre, amivel az állatokat kezelik, az fenyegeti a kezelés sikerességét[8]. Ez felesleges antibiotikum felhasználáshoz vezet, amely növeli a kockázatát a rezisztens kórokozók kialakulásának, emellett anyagi kárt okoz, és az állatjólétre is negatívan hat. Kiskérődzőkben a felhasznált antimikrobiális szerek nagy hányadát a *P. multocida* valamint a *M. haemolytica* okozta fertőzések kezelése miatt alkalmazzák[9]. Az állatállomány kezelése során például súlyos, heveny esetben, vagy kis létszámú állomány esetén nem mindig végeznek antibiotikum érzékenységi vizsgálatot. Az antibiotikum érzékenységi vizsgálat időigényes, leggyorsabb esetben is 2-3 nap alatt várható az eredménye. Sokszor inkább azonnal meg kell kezdeni az antibiotikumoz kezelést, nehogy súlyosbodjon a betegség. Azonban ez nem zárja ki az antibiotikum érzékenységi vizsgálatot. Ilyen esetben mintát vesznek amit laborba küldenek, majd a korábbi ismeretek, tapasztalatok alapján

kezdik el az antibiotikus kezelést. Ha megjön az eredmény, esetlegesen módosíthatnak a választott szeren.

Ezért is célszerű adatokat gyűjteni a kórokozók antimikrobiális szer érzékenységéről, hogy az azonnali antibiotikus kezelés esetén el lehessen dönteni, melyik szert érdemes használni az adott országban. De még jobb ha régióként vagy állomány szinten ismerjük a rezisztencia helyzetét[10, 11]. A kiskérődzőkből izolált *P. multocida* törzsek antibiotikum érzékenységéről kevés információ van világszerte[10]. Ezért is fontos erről további adatokat gyűjteni. Általában magában az antibiotikus kezelés nem oldja meg a problémát, ha a betegségre hajlamosító körülményeket nem változtatják meg, a kezelés után többnyire visszatér a betegség[1].

Az antimikrobiális szerek túlzott használata multirezisztens kórokozók kialakulásához, szelekciójához és terjedéséhez vezetett[12]. Az élelmiszertermelő állatokban az antibiotikumok használata mind a patogén, mind a kommenzalista baktériumokra szelektív nyomást fejt ki, ami növeli a rezisztens baktériumok arányát. Ez megnehezíti a betegségek gyógyítását, és a költségeket is növeli. Továbbá az élelmiszereken keresztül a fogyasztókhöz is eljuthatnak a rezisztens baktériumok, melyek a rezisztenciagének rezervoárjaként funkcionálhatnak, így a humán orvoslásban is megnehezíthetik a fertőzések eredményes kezelését[11, 13].

5 Szakirodalmi áttekintés

5.1 A *Pasteurella multocida* tulajdonságainak jellemzése

5.1.1 Morfológia

A *P. multocida* 0.3-1.0 mikrométer széles, és 1.0-2.0 mikrométer hosszú, Gram-negatív, coccoid pálcá alakú baktérium. Csillói nincsenek, így nem képes mozgásra, spórát nem képez. Egyes törzsek fimbrával, a virulens törzsek poliszacharid burokkal rendelkeznek. Friss tenyészetből, vagy közvetlenül az állatból származó mintából megfestve egyes példányok bipoláris festődést mutatnak [1, 2, 14].

5.1.2 Tenyésztés

A *P. multocida* tápigényes baktérium, tenyésztéséhez jó minőségű véresagart, vagy vérsavót és élesztőkivonatot is tartalmazó táptalajt igényel. A kórokozó az elváltozott szervekből, a beteg állatok orrváladékából is kitenyészthető, az optimális tenyésztési hőmérséklete 37 °C. Aerob, fakultatív anaerob. Szürkésfehér, fénylő, sima szélű telepei vannak, a telepei 24 óras tenyésztés alatt kinőnek. A tenyészetek jellegzetes, vadgesztenyére emlékeztető szaga van. Véres agaron nem mutat hemolízist. MacConkey agaron nem képes növekedni. Az emlősökből izolált törzsek általában burkosak, a telepeik nyúlósak, nyálkásak [1, 2, 14].

5.1.3 Biokémiai tulajdonságok

A *P. multocida*, és a *Mannheimia* és *Bibersteinia* nemzetségek közös tulajdonsága, hogy a kataláz és oxidáz teszten pozitívak, a szénhidrátokat fermentatív módon bontják, a nitrátot nitritté redukálják[2].

A fajszintű azonosítást másodlagos tesztek segítségével lehet elvégezni[7]. A *P. multocida* másodlagos biokémiai tulajdonságait az 1. táblázatban jelölöm:[14].

1.táblázat

Másodlagos tesztek a *P. multocida* azonosítására

ornitin dekarboxiláz	indol	ureáz	glükóz bontás	laktóz bontás	szacharóz bontás	maltóz bontás	mannit bontás	trehalóz bontás
+	+	-	+	-	+	-	+	változó

5.1.4 Ellenálló képesség

Ellenállóképesége alacsony, hűtőben, táptalajon körülbelül 1 hétig marad életben. Érzékeny a táptalaj kémhatására, a semleges vagy a kissé lúgos táptalajt kedveli, és ha folyékony táptalajban a szénhidrát bontás miatt savas lesz a pH, gyorsabban elpusztul[2].

Elhullott állatokban, tavakban hetekig túlél, viszont kiszáradva 2-3 nap alatt elpusztul. 60 °C-on pár perc alatt elpusztul. Érzékeny a jód, a nátrium-hipoklorit, és a formalin tartalmú fertőtlenítőszerre[1]. Hosszabb ideig fenntartani -80°C-on lefagyasztva vagy liofilizálva lehet.

5.1.5 Antigénszerkezet

Napjainkban leggyakrabban a Heddleston és a Carter -féle tipizálási rendszer terjedt el. A Carter féle rendszer szerint 5 típus van, az A, B, D, E, és F. Ezeket a típusokat passzív hemagglutinációs próba segítségével, a poliszacharid burokantigénjeik szerint sorolták be. A Heddleston féle rendszer szerint pedig 16 szerotípus van, ezt úgy határozták meg, hogy agargél precipitációs próba segítségével vizsgálták a törzsek kivonat-antigénjeit[1, 2, 15]. Juhokban, és egyéb kérődzőkben, egyes baromfifajokban (főként kacsa, pulyka, lúd), sertésben, nyúlban leggyakrabban a *P. multocida* A, ritkábban a D típusú törzsek okoznak betegséget[2]. A burokkal rendelkező törzsek általában virulensebbek, mint a burok nélküli változatok[3].

5.1.6 Patogenitás

A kórokozó általában más fertőzött állatok váladékainak belélegzésével, vagy szájon át fertőzi meg az állatot. Fakultatív patogén, általában előfordul a klinikai tüneteket nem mutató juhok felső légútainak nyálkahártyáin, valamint a mandulákban is. Főleg az alacsony virulenciájú törzsekre jellemző a tartós megtelepedés és a tünetmentes fertőzés. A kórokozó hajlamosító tényezők hatására betegséget okozhat, ilyenek például: szállítás, éhezés, stressz, huzatos, hideg istálló, nedves alom, szelén hiány, mikotoxinok a takarmányban, bárányoknál az elválasztás, és egyes vírusos fertőzések, például adenovírusok, reovírusok, Parainfluenza 3 vírus, Respiratory syncytial virus[1, 5–7].

A *P. multocida* juhokban főleg légzőszervi megbetegedést okoz. Kifejlett juhokban többnyire félheveny, kruppos tüdő és mellhártya gyulladás alakul ki, általában a cranialis tüdőlebenyeken. Náluk a betegség hetekig eltarthat, az állatok nehezen vesznek levegőt, lefognak, gyakori a középfül gyulladás miatti egyensúlyzavar és ferde fejtartás, emellett

ízületgyulladások alakulhatnak ki, emiatt gyakran sánták lesznek az állatok. A betegség tünetei függenek többek között az állat korától, a baktérium patogenitásától. A beteg állatok lázasak, köhögnek, gyors, felületes a légzésük és gyors a pulzusuk. Kezdetben savós, később nyálkás-gennyes orrfolyást látunk, az állatok étvágytalanok[1]. A kórokozó miután elszaporodott a felső légutakban, képes eljutni a hörgőkbe, a tüdőbe, és így képes bronchopneumoniát okozni[6].

Újszülött és szopós bárányban okozhat heveny septicaemiát is, ami miatt az állatok általában pár nap alatt elpusztulnak. A boncolásuk során a mell és a hasüregben vörhenyes savó felhalmozódás, megduzzadt, sokszor sötétvörös nyirokcsomók, és apró vérzések jellemzőek a savóshártyák alatt, de a lép normális. Meleg éghajlatú országokban felnőtt juhokban is gyakran okoz heveny septicaemiát[1].

A kórokozó a szarvasmarhák légzőszervi betegségkomplexének (BRDC) is része lehet [16, 17]. Ezen kívül a *P. multocida* B trópusi országokban a szarvasmarha, a bivaly, és egyéb kérődzők vérzéses septicaemiáját okozza[1–3]. A *P. multocida* a juhok légzőszervi betegségkomplexének (ORDC)- nek is tagja lehet[5].

5.1.7 Megelőzés, védekezés, kezelés

Javasolt az állatok átcsoportosításának, keverésének kerülése, és például a hízlalás céljából tartott, több helyről származó állatok kisebb csoportokban tartása[1, 5]. Új állatok állományba való beállítása előtt fontos a karanténozás, továbbá a beteg állatok elkülönítése. Amennyiben lehetséges, célszerű zártan tartani az állatokat, hogy például vadon élő állatokkal ne érintkezessenek. A hajlamosító tényezőket meg kell szüntetni, mert különben a betegség általában újra kialakul[1].

Vaksinálni is lehet ellene, és antimikrobiális szereket alkalmazni terápiás vagy metafilaxiás céllal[1, 5]. Viszont sajnos kevés juhokra engedélyezett vakcina elérhető[5]. Egyes országokban forgalmaznak az elölt kórokozókat, vagy azok a kivonatát, valamint adjuváns anyagot is tartalmazó vakcinákat. A vakcinák többnyire rossz hatékonyságúak, mert a sejtfal, valamint a burok antigének gyenge antigenitásúak. Emellett az egyes *P. multocida* törzsek változatos antigénekkal rendelkeznek, így azok a törzsek, amelyekből a vakcinákat készítették, sokszor nem nyújtanak védelmet az állományban betegségeket okozó törzsekkel szemben[1]. Ennek a kiküszöbölésére lehet alkalmazni telepspecifikus vakcinákat (autovakcinákat), amelyeket az adott állományból izolált, megbetegedést okozó törzsekből

készítenek. Hízóbárányokban a *P. multocida* vakcinák egyes esetekben jelentősen csökkentették az elhullás arányát, máskor viszont egyáltalán nem észleltek javulást[1]. Ezért az antibiotikumok továbbra is fontosak maradnak ennek a betegségnek a kezelésében[5].

Az antibiotikus kezelést parenterális beadással kell végezni, úgy, hogy a terápiás antibiotikum szint legalább 7 napon keresztül fennmaradjon. Így a betegség kezdeti szakaszában kezelve az állatok nagyobb része túléli a betegséget. Az antibiotikus kezelés ellenére a baktérium hordozása többnyire fennmarad az állomány jelentős részében.

5.2 A választott antibiotikumok jellemzése:

Az általam választott antibiotikumok lefedik a fontosabb antibiotikum csoportokat, alkalmazható szerek a juhok pasteurellosisának kezelésére. A *P. multocidának* ezen antibiotikumokkal szemben kialakult rezisztencia arányait számos cikkben is vizsgálták.

5.2.1 Oxitetraciklin:

Az oxitetraciklin a tetraciklinek közé, azon belül a rövid hatású tetraciklinek közé tartozik. Bakteriosztatikus antibiotikum. Hatásmechanizmusát tekintve a fehérjeszintézist gátolja a riboszóma 30S alegységén. Eredetileg széles antibakteriális spektrummal bírt, számos Gram-negatív és pozitív baktérium ellen hatásos volt. Viszont az évtizedeken át tartó használat miatt, és mivel sokáig alacsony dózisban hozamfokozásra is használták, nagyon gyakori vele szemben a szerzett rezisztencia.[18]

5.2.2 Enrofloxacin

Az enrofloxacin a fluorokinolonok közé tartozik, azon belül a 2.2. generációba. Kémiai úton előállított anyag, Gram-negatív baktériumok ellen kifejezetten hatékony, így a Pasteurellaceae családba tartozó baktériumok ellen is. A baktériumok DNS-topoizomeráz enzimjét gátolja, a hatásmódja koncentrációfüggő baktericid. A túl gyakori alkalmazás, a túl kis dózisok alkalmazása hozzájárul a fluorokinolonokkal szembeni rezisztencia kialakulásához. Általában a *gyrA* és *parC*-nevű géneken történik mutáció, amely miatt változás történik a baktérium topoizomeráz enzim kötőhelyén, így az antibiotikum nem tud kötődni hozzá.[18]

β-laktám antibiotikumok:

A β-laktám antibiotikumok közé tartoznak többek között a penicillinek és a cefalosporinok. Ezen antibiotikumoknak β-laktám váza van, és gátolják a baktériumok sejtfalában a peptidoglikán váz szintézisét.[18]

5.2.3 Penicillin

A penicillinek a β-laktám antibiotikumok csoportjába tartoznak. A benzilpenicillint (=penicillin G) a penicillineken belül a szűk spektrumú penicillinekhez sorolják. Főleg Gram-pozitív baktériumokra hat, de a Gram-negatív tápigényes baktériumok is érzékenyek rá, így a *P. multocida* is. Hatásmódja szerint időfüggő baktericid. Különböző sóit, észtereit használják, például benzilpenicillin-Na és K sója, benzilpenicillin-benzatin, és benzilpenicillin-prokain. Nagyon gyakori a penicillinekkal szembeni rezisztencia, a szerzett rezisztenciát vele szemben leggyakrabban a baktériumok β-laktamáz enzim termelése okozza. A benzilpenicillin érzékeny ezekre a β-laktamáz enzimekre.[18]

5.2.4 Amoxicillin

Az amoxicillin a szélesített spektrumú penicillinek közé tartozik. A Gram-pozitív baktériumok mellett hatékony Gram-negatív baktériumokra is. Időfüggő baktericid. Szintén érzékeny a β-laktamáz enzimre, így az ezt termelő baktériumok rezisztensek vele szemben. Ezek ellen lehet kombinálni β-laktamáz gátlókkal, leggyakrabban klavulánsavval kombinálják.[18]

5.2.5 Ceftiofur

A ceftiofur a cefalosporinokon belül a 3. generációba tartozik. A Gram-pozitív baktériumokkal szemben változó hatékonyság jellemzi, de nagyon jól hat Gram-negatív baktériumokkal szemben. A Pasteurellaceae család tagjai ellen is hatékony. Időfüggő baktericid. A szerzett rezisztencia cefalosporinokkal szemben leggyakrabban szintén a baktériumok β-laktamáz termelése révén alakul ki. A ceftiofur kifejezetten ellenálló sok β-laktamázzal szemben. A ceftiofur hidroklorid sója, nátriumsója gyors felszívódású, a ceftiofur-Na-ot *P. multocida* ellen a juhokban naponta egyszer kell alkalmazni. Ezzel szemben a lassú felszívódású ceftiofur kristályos szabad sav- nevű formája lassan szívódik

fel, 6 napon keresztül is elegendő mennyiségben van jelen a bronchusváladékban, és a vérplazmában a pasteurellákkal szemben.[18]

5.2.6 Florfenikol

A florfenikol a fenikolok csoportjába tartozik. Néhány patogén baktériumot kivéve a legtöbb Gram-pozitív és Gram-negatív kórokozóval szemben hatékony. Hatékony a Pasteurellaceae családra is. A klóramfenikollal szemben a florfenikolt szabad élelmiszertermelő állatoknak adni. Hatásmechanizmusa a bakteriális fehérjeszintézis gátlása, a riboszómák 50S-alegységén. Bakteriosztatikus antibiotikum. Szerzett rezisztencia vele szemben kialakulhat a permeabilitás csökkenése, vagy enzimek általi lebontás révén is, mindkét rezisztencia génjei előfordulnak plazmidokon. A permeabilitás csökkenése kromoszómán is kódolódhat.[18]

5.2.7 Gentamicin

A gentamicin az aminoglikozidok közé tartozik. Az aminoglikozidok közül az egyik legfontosabb, legtöbbször használt antibiotikum a állatorvoslásban, és a humán gyógyászatban is. Kifejezett Gram-negatív aerob baktériumok elleni, valamint Staphylococcusok elleni hatás jellemzi. Csak aerob körülmények között hatékony, így például légúti kórképekben is használható. (Fakultatív anaerob kórokozók esetében nem hat, ha a környezet anaerob.) A baktériumok riboszómájának 30S alegységén gátolja a fehérjeszintézist. Misztranszlációt okoz, nem rögtön gátolja a transzlációt, így a keletkező hibás membránfehérjék okozzák főleg a baktériumölő hatást. Koncentrációfüggő baktericid hatású. A szerzett rezisztenciát vele szemben leggyakrabban plazmidokon kódolt enzimek okozzák, melyek inaktíválják az antibiotikumot. Emellett a baktériumok sejtfalának áteresztőképesség-csökkenése is csökkentheti azok érzékenységét a gentamicinre.[18]

5.2.8 Szulfametoxazol+Trimetoprim

A szulfametoxazol+trimetoprim egy potencírozott szulfonamid, a szulfonamidok közé tartozó szulfametoxazol, és a diamino-pirimidinek közé tartozó trimetoprim kombinációja. A szulfonamidokat általában így, kombináltan használják, diamino-pirimidinekkel együtt. A szulfametoxazol széles antimikrobiális hatású, sok Gram-pozitív és Gram-negatív baktérium ellen hatásos. A *P. multocida* viszont csak mérsékelten érzékeny vele szemben. A trimetoprim is széles antimikrobiális hatású, szintén hatékony sok Gram-pozitív és Gram-

negatív baktériumra. Anaerob baktériumokkal szemben hatástalan. A két antibiotikum kombinációja, a szulfametoxazol+trimetoprim antimikrobiális spektruma szélesebb, mintha külön-külön adnánk őket, egymás hatását erősítik, szinergisták. A *P. multocida* a kombinációjukra már kifejezetten érzékeny. Mindkét anyag a baktériumok folsavsintézisét gátolja, amely elengedhetetlen a nukleinsavak képzéséhez. A szulfametoxazol a dihidropteroát-szintáz enzim kompetitív antagonistája, gátolja a para-amino-benzoészavból történő dihidro-folsav képzését. A trimetoprim a dihidrofolát-reduktáz enzimet gátolva akadályozza a dihidro-folsav tetrahydro-folsavvá történő alakítását, amely a folsav biológiailag aktív formája. Külön-külön adva a szulfametoxazolt és a trimetoprimot bakteriosztatikusak, együtt viszont időfüggő baktericid hatásúak. A szulfametoxazollal és a trimetoprimmal szemben is igen elterjedt a szerzett rezisztencia, a rezisztenciát mindkét anyaggal szemben közvetíthetik plazmidokon, és integronokon lévő gének. A szulfametoxazollal szembeni rezisztencia létrejöhet a baktérium sejtfalának csökkent áteresztő képessége, a megnövekedett PABA termelés által, és olyan dihidropteroát enzim képződése révén, amely jobban kötődik a PABA-hoz. A trimetoprimmal szembeni rezisztencia kialakulhat olyan dihidrofolát-reduktáz enzim termelésével, amely kevésbé kötődik a trimetoprimhoz, valamint kialakulhat a nagyobb mennyiségű dihidrofolát-reduktáz enzim termelésével. A két antibiotikum kombinációjával szembeni rezisztencia ritkább, mint külön-külön a szulfametoxazollal és trimetoprimmal szemben.[18]

5.2.9 Tiamulin

A tiamulin a pleuromutilinek közé tartozó antibiotikum. Gram-pozitív baktériumokra, és Gram-negatív anaerob baktériumokra hatékony, nagyon hatékony mycoplasmák és *Brachyspira hyodysenteriae* ellen, a Gram-negatív aerob baktériumok viszont csak mérsékelten érzékenyek vele szemben. *P. multocida* ellen kevésbé hatékony. A tiamulin a baktériumok riboszómájának 50S alegységén gátolja a fehérjeszintézist, hatásmódja bakteriosztatikus. A szerzett rezisztenciát vele szemben leginkább kromoszómán kódolt rezisztenciagének okozzák, aránylag ritka. Ugyan a pleuromutilineket, így a tiamulint sem használják a humán orvoslásban, csak az állatgyógyászatban, viszont egyirányú keresztrezisztencia léphet fel a makrolidokkal. Ezáltal egy tiamulinra rezisztens kórokozó rezisztens lehet egyes makrolidokra, amik fontosak lehetnek a humán gyógyászatban is. A tiamulinnal szembeni rezisztencia kialakulását általában könnyen meg lehet előzni a körültekintő használatlal.[18]

Makrolid antibiotikumok:

A makrolidok a baktériumok riboszómájának 50S alegységén gátolják a fehérjeszintézist. Hatásmódjuk bakteriosztatikus, azonban a légutakban fertőzést előidéző Gram-negatív tápigényes baktériumokkal szemben, így a *P. multocidával* szemben is a legtöbb hatóanyag baktericid hatású. A makrolidokkal szembeni rezisztencia létrejöhet úgy, hogy a baktérium enzimeket szintetizál, amelyek hidrolizálják az antibiotikumot, létrejöhet úgy, hogy a baktérium riboszómáján lévő kötőhely megváltozik, valamint az antibiotikumot fokozott mértékben kipumpálhatja a baktérium. Ez a folyamat, amely fokozott efflux-al (kipumpálással) jár, képes mobilis genetikai elemekkel terjedni.

A rezisztencia akár a kezelés alatt is, igen hamar kialakulhat. Legtöbbször kromoszomális mutáció okozza a rezisztenciát makrolidokkal szemben, viszont ez sokszor instabil. Ritkán plazmidok útján létrejövő rezisztencia is kialakulhat. A hatóanyagok között keresztrezisztencia fordulhat elő, ezért is fontos a szakszerű használatuk, hiszen a rezisztens kórokozó a humán gyógyászatban is használt antibiotikumokkal szemben is rezisztens lehet.[18]

5.2.10 Tilmikozin

A tilmikozin makrolid antibiotikum. Hatékony a Gram-negatív tápigényes baktériumokra. A *P. multocidára* nagyon hatékony, ám a rezisztencia is gyakran kialakul a baktériumtörzsekben. Emellett hatékony Gram-pozitív baktériumokra, mycoplasmákra is. Egy subcutan adott injekcióval 3 napos terápiás szint érhető el a tüdőben, újabb adagot többnyire nem kell beadni. [18]

5.2.11 Tulatromicin

A tulatromicin szintén makrolid antibiotikum. Gram-negatív tápigényes baktériumok ellen, mycoplasmák ellen jól hat, Gram-pozitívok ellen viszont kevésbé hatékony mint a tilmikozin. A tüdőben a vérplazmához képest 50-180-szoros koncentrációra dúsul fel, hosszú ideig hatékony koncentrációban van jelen, felhalmozódik az alveolaris makrofágokban és granulocitákban is. Lassan ürül a szervezetből. [18]

5.3 Az antimikrobiális rezisztencia előfordulása a világ különböző részein élő juh állományokban

Egy etiópai tanulmányban, Etiópia Haramaya körzetében végeztek antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat tüdőgyulladásos juhokból izolált *P. multocida* és *M. haemolytica* baktériumtörzsekből.[7] 2007 november- 2008 április- között végeztek mintavételt. A tüdőgyulladás klinikai tüneteit mutató juhok orrváladékából vettek orrtampon, valamint vágóhídi tüdőgyulladásos tüdőkből vett tüdőtampon mintákat vizsgáltak. A levágott állatok nem mutattak vágás előtt betegségre utaló tüneteket. A vizsgálatokat korongdiffúziós módszerrel végezték. 256 mintából összesen 64 juhból izoláltak Pasteurellaceae családba tartozó baktériumot, és a 64-ből 8 törzs volt *P. multocida*, míg a többi *M. haemolytica* volt. *P. multocidát* csak orrtampon mintából izoláltak, tüdőből nem. Tehát a vágóhídi mintákból nem izoláltak *P. multocidát*, csak élő állatból származó mintából. Az antibiotikum érzékenységi vizsgálat eredményét táblázatban jelölöm: (2. táblázat, [7]). Az eredmények azt mutatják, hogy a törzsek csak korlátozott mértékben voltak érzékenyek az antibiotikumokra, ezért a kritikus eseteket kivéve kezelés előtt antibiotikum érzékenységi vizsgálatot kell végezni[7].

2. táblázat

A *P. multocida* törzsek antibiotikum érzékenysége a [7]-es tanulmány alapján. A rövidítések a következő antibiotikumokat jelölik: ampicillin: AMP, klóramfenikol: CHL, gentamicin: GEN, tetraciklin: TET, penicillin: PEN, sztreptomycin: STR, szulfametoxazol: SFL, vankomicin: VAN.

antibiotikumok	AMP	CHL	GEN	TET	PEN	STR	SFL	VAN
érzékeny	50%	100%	0%	87.5%	25%	12.5%	87.5%	0%
rezisztens	50%	0%	100%	12.5%	75%	87.5%	12.5%	100%

Egy újabb, 2023-ban megjelent, szintén Etiópiában készült tanulmányban orrtampon mintákat vettek légzőszervi tüneteket mutató és tünetmentes juhokból is. A mintákból izolált *P. multocida* (és *M. haemolytica*) törzsek antibiotikum érzékenységi vizsgálatát is elvégezték, korongdiffúziós módszerrel. 148 db orrtampon mintát vettek juhokból, ebből 5 db *P. multocida* törzset izoláltak, amiből 2 törzs tünetmentes állatokból, 3 db pedig légzőszervi tüneteket mutató juhokból származott.[19] A törzsek antibiotikum-érzékenységét a 3. táblázatban jelölöm:[19]

3. táblázat

Az 5 db *P. multocida* törzs antibiotikum érzékenysége a [19]-es tanulmány alapján. A rövidítések a következő antibiotikumokat jelölik: amoxicillin: AMX, klóramfenikol: CHL, gentamicin: GEN, tetraciklin: TET, penicillin: PEN, vankomicin: VAN, sztreptomycin: STR, szulfametoxazol+trimetoprim: SXT

antibiotikumok	AMX	CHL	GEN	TET	PEN	VAN	STR	SXT
érzékeny	20%	100%	80%	80%	20%	0%	20%	60%
rezisztens	80%	0%	20%	20%	80%	100%	80%	40%

Egy spanyolországi vizsgálatban többek között házijuh légúti fertőzéseiből vettek orrtampon mintákat 24 juhból, egy pireneusi nemzeti vadrezervátumban, ahol a legeltetési időszak alatt a vadon élő állatok (például a Pireneusi zerge, a *Rupicapra pyrenaica*) egy helyen élnek a házi juhokkal. 2015 és 2017 között vették a mintákat. Leves-mikrohígítási módszerrel határozták meg a MIC- értékeket. Csak egy *P. multocida* törzset izoláltak a juhból, és az az összes vizsgált antibiotikumra érzékeny volt (ampicillin, ceftiofur, danofloxacin, enrofloxacin, florfenikol, klórtetraciklin, oxitetraciklin, penicillin, tilmikozin, tulatromicin) A pireneusi zergéből izolált 19 db *P. multocida* törzs között 7 db közepesen vagy teljesen rezisztens törzs is előfordult. [12]

Egy franciaországi tanulmányban *P. multocida* antibiotikum érzékenységi adatokat elemeztek, az antimikrobiális rezisztencia francia nemzeti felügyeleti hálózatának (RESAPATH) adatait. Ezek az adatok 2012 januárja és 2017 decembere között izolált törzsekből származtak, több állatfaj légúti megbetegedéseiből izolálták a kórokozót. A laboratóriumok korongdiffúziós vizsgálatokkal nyertek adatokat. A juhból izolált törzsek rezisztencia aránya 10% alatt volt. A juhból izolált törzsek rezisztencia adatait a 4. táblázatban jelölöm.[4] A tanulmányban a rezisztens és mérsékelten érzékeny törzseket összevonták, és a rezisztens csoportba sorolták. Csak olyan állatfajokat vizsgáltak a tanulmányban, amelyekből legalább 100 db *P. multocida* törzset izoláltak, juhok esetén az egyes antibiotikumonként eltérő számú, minimum 193, maximum 311 db törzset vizsgáltak.

4. táblázat

Juhból izolált *P. multocida* törzsek antibiotikum érzékenysége a [4]-es tanulmány alapján. A rövidítések a következő antibiotikumokat jelölik: amoxicillin: AMX, gentamicin: GEN, tetraciklin: TET, szulfametoxazol+trimetoprim: SXT, florfenikol: FFN, tilmikozin: TIL, nalidixinsav: NAL, enrofloxacin: ENR.

antibiotikumok	AMX	GEN	TET	SXT	FFN	TIL	NAL	ENR
rezisztens	2.3%	6.7%	4.5%	7.1%	0.0%	7.3%	2.7%	1.4%

A tanulmány szerint Franciaországban 1995 óta gyakran használnak florfenikolt például *P. multocida* ellen élelmiszertermelő állatokban, ám az mégis 1%-nál alacsonyabb rezisztenciát mutatott vele szemben minden állatfajban. Viszont a bélben élő kommenzalista *E. coli*-ban kiszelektálódtak a rezisztens törzsek. Tehát rendszeresen vizsgálni kell mind a patogén, mind a kommenzalista törzsek rezisztenciáját, mert egy antibiotikus kezelés mindegyikre szelektációs nyomást gyakorol. Ezért annak ellenére, hogy a pasteurellák rezisztencia szintje általában alacsonyabb, az antibiotikumokat így is körültekintően kell alkalmazni.[4].

A következő tanulmányban 60 spanyolországi és portugáliai juh hízlaldából származó 128 db juhból vettek mintát. A mintákat légzőszervi tüneteket mutató juhból, vagy boncolás során tüdőgyulladásos elváltozását mutató tüdőkből vették, 2015 február és 2019 március között. Az élő állatokból tracheobronchiális lavage segítségével, egy esetben pedig orrtamponnal vettek mintát. Minden telepről, ahol légzőszervi betegségben szenvedő állatok voltak, min.3, max. 5 juhból vettek mintát. Megállapították öt véletlenszerűen kiválasztott *P. multocida* törzs MIC értékeit, leves-mikrohígítós módszer valamint Epsilon teszt (E-teszt) segítségével is, amivel azt vizsgálták, hogy nagyjából azonos eredményeket kapnak-e a két technikával. Mivel megfelelő szintű volt az egyezés a két módszer között, így a további törzsek esetén az E-tesztet alkalmazták. 60 db *P. multocida* törzset izoláltak, és vizsgáltak. Meghatározták a MIC értékeket, és rezisztensnek valószínűleg azok a törzsek számítanak, ahol a MIC érték az ECOFF-érték felett van. Ezek alapján a törzsek érzékenységét az 5. táblázatban jelölöm[5]. Azért ezeket az antibiotikumokat vizsgálták, mert ezeket adják ezekben az országokban legtöbbször a premixbe, vagy az ivóvízbe juttatva, bárányok kezelésére [5].

5. táblázat

A 60 db *P. multocida* törzs antibiotikum-érzékenysége az [5]-ös tanulmány alapján. A rövidítések a következő antibiotikumokat jelölik: szulfametoxazol+trimetoprim: SXT, tetraciklin: TET, enrofloxacin: ENR, doxiciklin: DOX.

antibiotikumok	SXT	TET	ENR	DOX
rezisztens	16.7%	40%	15%	11.7%

Egy korábbi, spanyolországi vizsgálatban 87 db, juhokból izolált *P. multocida* törzs antibiotikum-érzékenységét vizsgálták leves-mikrohígításos módszerrel, 18 antibiotikummal. A mintákat 2001 és 2009 között vették, többségében tüdőgyulladásos megbetegedésekből. A vizsgált törzsek rezisztencia adatait a 6. táblázatban jelölöm[8].:

6. táblázat

A 87db *P. multocida* törzs antibiotikum-érzékenysége a [8]-as tanulmány alapján. A rövidítések a következő antibiotikumokat jelölik: : ampicillin: AMP, ceftiofur: CEF, klindamicin: CLI, klórtetraciklin: CTET, danofloxacin: DANO, enrofloxacin: ENR, florfenikol: FFN, gentamicin: GEN, neomicin: NEO, oxitetraciklin: OXY, penicillin: PEN, szulfadimetoxin: SDM, spektinomicin: SPE, szulfametoxazol+trimetoprim: SXT, tiamulin: TIA, tilmikozin: TIL, tulatromicin: TUL, tylosintartarát: TYLT.

antibiotikumok	AMP	CEF	CLI	CTET	DANO	ENR	FFN	GEN	NEO
rezisztens (%)	100	0	100	0	0	0	0	0	0
antibiotikumok	OXY	PEN	SDM	SPE	SXT	TIA	TIL	TUL	TYLT
rezisztens (%)	16.1	1.2	73.6	0	0	31.0	29.9	1.2	96.6

Egy törökországi tanulmányban több állatfajból izoláltak *P. multocida* törzseket. Köztük volt 33db 1-7 hónapos juh tüdejéből izolált törzs. Ezeket a juhokból származó mintákat 2001-2004, 2006-2009, és 2011-2012 között gyűjtötték. A minták főleg a közép-anatóliai Konya tartományból származtak, mindegyik külön állományból. Mindegyik tüdőminta légzőszervi megbetegedésben szenvedő juhból származott. A 33 törzs közül 20-ból végeztek antibiotikum-érzékenységi vizsgálatot, korongdiffúziós módszerrel. A következő antibiotikumokra vizsgálták: enrofloxacin, ceftiofur, eritromicin, florfenikol, penicillin, spektinomicin, szulfametoxazol+trimetoprim, tetraciklin, tilmikozin. Csak egy

vizsgált, juhból izolált törzs mutatott rezisztenciát, eritromicin-re és tilmikozin-ra volt rezisztens[10].

Egy tanulmányban a dél-indiai Karnataka tartományban, légzőszervi megbetegedésben szenvedő, valamint ránézésre egészséges és egészséges állományból származó juhból izolált *P. multocida* és *M. haemolytica* törzsek antibiotikum-érzékenységét vizsgálták. A ránézésre egészséges, és a tüneteket mutató állatokból orrtampon mintákat vettek, valamint vágóhídon tüdő mintákat gyűjtöttek elváltozást mutató, és egészséges tüdőkből is. 2015 április - 2016 december között gyűjtötték a mintákat. Összesen 28 db. *P. multocida* törzs antibiotikum érzékenységét vizsgálták, korongdiffúziós módszerrel[6]. Az eredményeket a 7. táblázatban jelölöm[6]:

7. táblázat

A 28 db *P. multocida* törzs antibiotikum-érzékenysége a [6].tanulmány alapján. A rövidítések a következő antibiotikumokat jelölik: amoxicillin/klavulánsav:AMC, szulfametoxazol+trimetoprim:SXT, ampicillin:AMP, penicillin:PEN, enrofloxacin:ENR, klóramfenikol:CHL, gentamicin:GEN, sztreptomycin:STR, oxitetraciklin:OXY, tetraciklin:TET.

antibiotikumok	AMC	SXT	AMP	PEN	ENR
mérsékelten érzékeny	0%	0%	0%	0%	7.1%
rezisztens	3.6%	3.6%	0%	46.4%	0%
antibiotikumok	CHL	GEN	STR	OXY	TET
mérsékelten érzékeny	0%	3.5%	3.5%	0%	0%
rezisztens	0%	7.1%	7.1%	7.1%	0%

1 antibiotikumra a törzsek 39.3%-a volt rezisztens, míg 3 vagy 3-nál több antibiotikumra az izolátumok 7.1%-a (2 db törzs) volt rezisztens[6]. Az összes antibiotikumra érzékeny volt a törzsek 53.6%-a, és nem volt olyan törzs amely pontosan 2 antibiotikumra lett volna rezisztens[6].

PCR-rel antibiotikum rezisztencia géneket is szűrtek, azonban az így kapott eredmények nem mutattak egyezést a korongdiffúziós módszerrel kapott eredményekkel[6]. A PCR-rel kapott eredményeket a 8. táblázatban jelölöm[6]:

8. táblázat

PCR-rel kimutatott antibiotikum rezisztencia gének a[6]-os tanulmány alapján. Itt is mind a 28 törzset vizsgálták.

	orrtaupon mintából izolált törzsek (összesen 13db)	tüdő mintából izolált törzsek (összesen 15db)
sztreptomicin (strA)	5	9
szulfametoxazol (sul2)	3	9

További rezisztenciagénekre is szűrtek PCR-rel, azonban ezek nem fordultak elő a törzsekben. Ezek a következő gének voltak: penicillin (bla_{OXA-2}), ampicillin (bla_{ROB-1}), klóramfenikol ($catAII$), tetraciklin ($tetH$), gentamicin ($aadB$)[6].

5.4 Az antimikrobiális rezisztencia gének terjedése a Pasteurellaceae családban:

5.4.1 A baktériumok közötti géntranszfer formái:

A baktériumok horizontális géntranszfer révén gyorsan szerezhettek antibiotikum rezisztencia géneket a környezetükből, vagy a környezetükben élő más baktériumoktól[20].

A horizontális géntranszfer formái lehetnek:[20]

Transzformáció: ekkor a környezetükben található oldott DNS-t veszi fel a baktériumsejt közvetlenül[20].

Transzdukció: Ekkor egy bakteriofág vírus visz át DNS-t egyik baktériumsejtből a másikba[20].

Konjugáció: Ilyenkor egy szexfimbria segítségével a donor baktériumból a recipiens baktérium felé jut el genetikai információ, egy irányban, egy citoplazma hídon át[2, 20].

Fúzió: A citoplazma membránok egyesülését jelenti egy másik sejttel, vagy olyan vezikula membránjával, amely DNS-t tartalmaz. A fúzió kevésbé gyakori folyamat mint az előbb felsoroltak[2, 20].

Az antibiotikum rezisztencia géneket tartalmazó plazmidok átadásában a konjugációnak van a legjelentősebb szerepe. [21]. A klinikai körülmények közötti rezisztenciagén terjedésben a transzformációnak és a transzdukciónak is szerepe van, de még nem tisztázott teljesen, hogy milyen mértékben[21].

5.4.2 makrolidokkal szembeni rezisztencia:

A *P. multocida* és a *M. haemolytica* baktériumfajokban felfedeztek 3 gént, az erm (42), az mph (E) és az msr (E) géneket. Ezen gének a baktérium kromoszómáján vannak kódolva, integratív és konjugatív elemek (ICE-k)-ben. Ezek a gének rezisztenciát okoznak az rRNS célhely metilációja, a makrolid kiáramlás, és a makrolidokat módosító enzimek révén[22].

Az ICE-k kisebb egységekből álló, helyváltoztatásra képes genetikai elemek, amelyek beépültek a baktérium kromoszómájába, és a sejt osztódása során ők is lemásolódnak, és

bekerülnek az utódsejtbe. Amikor indukálódik az ICE-k génexpressziója, akkor kivágódnak a baktérium kromoszómájából, egy kör alakú dsDNS plazmidot képeznek, és ezzel párhuzamosan termelődik egy konjugációs gépezet (aminek a génjeit ők kódolják), és amivel konjugáció révén átkerülhetnek egy recipiens sejtbe[20]. Beépülnek a recipiens sejt genomjába, és a donor sejt kromoszómájába is visszaépülnek. Tehát így, horizontális géntranszfer révén a rezisztencia géneket képesek továbbadni ezek a baktériumok[20].

Az előbb leírt 3 génen kívül más módon is létrejöhet a makrolidok és linkozamidok széles skálájával szembeni rezisztencia *P. multocida*-ban és *M. haemolytica*-ban. Beszámoltak európai szarvasmarhákból izolált *P. multocida* törzsekről, melyekben nem volt meg a korábban leírt 3 gén, mégis rezisztensek voltak a makrolidok (és a linkozamidok) széles skálájával szemben[22]. Ezekben a törzsekben a rezisztenciát 23S rRNS mutáció biztosította[22].

5.4.3 tetraciklinekkel szembeni rezisztencia:

Egy tanulmányban 13 db, Spanyolországban, sertésekből izolált *P. multocida* törzs közül 8 volt egyebek mellett tetraciklinre is rezisztens. 3 különböző, tet(B), tet(H), és tet(O) gént hordoztak, kis plazmidokon. A tet(B)-t a pB1001 plazmid, a tet(H)-t a p9956 plazmid, a tet(O)-t pedig a pB1006 plazmid hordozta[23].

Egy másik tanulmány, amely szarvasmarha és sertés légúti megbetegedéseiből izolált *P. multocida* és 3 *Mannheimia* fajból származó törzseket vizsgált, leírja, hogy számos „tet”-gén, azaz tetraciklin rezisztenciáért felelős gén transzpozonokhoz, vagy plazmidokhoz kötődik, és ezen rezisztencia gének könnyebben át tudják lépni a nemzetségek és fajok közötti határokat. Az USA-ból és Németországból származtak a vizsgált törzsek. Tet(H), tet(B) és tet(G) géneket találtak a törzsekben. Minden törzs rezisztenciát mutatott tetraciklinekkel szemben. A tet(H) gént 6 baktériumtörzsben mutatták ki plazmidon, azt a pMHT1-plazmid hordozta. Ez a plazmid az összes vizsgált baktériumfajban jelen volt. 3 db *P. multocida* törzs is hordozta ezt a plazmidot. Ez a plazmid csak tetraciklinnel szemben biztosít rezisztenciát. A további törzsekben lévő tet(B), tet(G) és tet(H) gének kromoszómálisak voltak. Amely törzsek hordozták a pMHT1-plazmidot, azok kromoszómáján nem volt tet-gén. A tet gén típusa és a rezisztencia mértéke között nem találtak összefüggést, és a tet gének másolatainak száma sem befolyásolta a rezisztencia mértékét.

8 db *P. multocida* törzset izoláltak, ebből 2 törzsben nem volt jelen plazmid. A többi izolátumban legfeljebb 3db, kis méretű plazmid volt található. A 8 törzs közül 3 volt rezisztens kanamicinre és / vagy szulfametoxazol+trimetoprimra és/ vagy ampicillinre is.

A pMHT1-plazmid eltérő fokú tetraciklinnel szembeni rezisztenciát biztosított a 4 vizsgált baktériumfajban. A *P. multocida*ban viszonylag alacsony szintű rezisztenciát okozott. Ez a plazmid elterjedt, különböző nemzetségekhez, fajokhoz tartozó baktériumok között, amelyek ugyanazon az élőhelyen élnek.

A *P. multocida*ban főleg a tet(H) gén okozza a tetraciklinekkel szembeni rezisztenciát. Ezt a gént más szerzők kimutatták egyéb plazmidokon is, és a baktérium kromoszómáján is, ezért azt feltételezik, hogy egy mobilis genetikai elem része lehet. Ezt megerősíti az, hogy egy szarvasmarhából izolált *P. multocida* törzs pPMT1-nevű plazmidján azonosítottak egy Tn5706- nevű transzpozont, amely tartalmaz tetR-tet(H) génklasztert, amelyet hozzá szorosan kapcsolódó inzerációs elemek zárnak. [24].

5.4.4 β -laktámokkal szembeni rezisztencia:

Egy tanulmányban Spanyolországban, sertésekből izolált 13 db, β -laktámokkal szemben magas szintű rezisztenciát mutató *P. multocida* törzset vizsgáltak[23]. Az antibiotikum-érzékenységi vizsgálatokat korongdiffúziós, és leves-mikrohígítási módszerrel is elvégezték. Mind a 13 törzs rezisztens volt ampicillinre, amoxicillinre, penicillinre, cefaklórra, szulfametoxazolra. Mindegyik törzs érzékeny volt cefotaximra. 8 törzs volt rezisztens közülük tetraciklinre is, 6 törzs pedig sztreptomycinre is rezisztens volt. 1db törzs rezisztens volt β -laktámokra, sztreptomycinre és tetraciklinre is egyszerre. A Gram-negatív baktériumok leggyakrabban nagy plazmidokban hordozzák a szerzett rezisztencia génjeiket, ám az ebben a tanulmányban vizsgált minden *P. multocida* törzs 2 vagy 3 db kis plazmidot tartalmazott[23]. A plazmidtartalom és a rezisztenciaprofil között egyértelmű összefüggést állapítottak meg. Ezekben a kis plazmidokban 1-2 antimikrobiális rezisztencia-determináns volt megtalálható. A cikk 7 db kis plazmidot említ, amit izoláltak, és ezek közül 2 plazmid kivételével az összes plazmidot sikeresen transzformálták *E. coli*-ba, ahol β -laktámok, sztreptomycin vagy tetraciklin ellen nyújtottak rezisztenciát. Köztük volt a pB1000 nevű plazmid is, amelyet transzformáltak az *E. coli* K-12 törzsbe. Ezt a plazmidot a 13 törzs közül 12- ben mutatták ki. Ez a plazmid a *bla*_{ROB-1} rezisztenciagént hordozza, és részt vesz a *Glaesserella parasuis* β -laktám rezisztenciájában is. Megállapították, hogy ezt

a gént mind a 13 törzs hordozta. Ezt a gént először *Glaesserella parasuis* –ban írták le. Ez a plazmid *E. coli*-ban nagyon instabil volt, de *P. multocida*-ban stabil.

A konjugációs kísérletben leves táptalajon, donorként pB1000-plazmiddal transzformált *E. coli* K-12 – es törzset használtak. Ez az *E. coli* K-12- es törzs a kromoszómájába épülve tartalmazta egy IncP nevű plazmid konjugációért felelős részét, ami révén a baktériumtörzs konjugációra képes. Ez a törzs sikeresen adta át a pB1000 plazmidot az *E. coli* K802N-törzsnek.

Annak ellenére, hogy a *bla*_{ROB-1} rezisztencia gén, amely β -laktamáz kódol, sikeresen expresszálódik enterobaktériumokban is, a ROB-1 β -laktamáz enzimet csak a Pasteurellaceae család klinikai izolátumaiból mutatták ki.

Megvizsgálták a pB1000 plazmid stabilitását *P. multocida* és *E. coli* törzsekben is. A tenyészeteket 3 példányban, 24 óránként, 5 napon keresztül oltották át, és tenyésztették őket. A *P. multocida* 5 nap tenyésztés után megtartotta a pB1000- plazmidot, és 100%-ban rezisztens maradt ampicillinnel szemben. De az *E. coli* az 1. nap után csak 18%-ban mutatott rezisztenciát, a 2. nap után csak 2%-ban volt rezisztens, és a 3. nap után teljesen érzékeny volt ampicillinre. Ezért valószínű, hogy a pB1000 plazmid szoros gazdafajlagossága az oka annak, hogy kizárólag a Pasteurellaceae családban van jelen a *bla*_{ROB-1} gén. A Pasteurellaceae családon belül ez a plazmid horizontálisan és vertikálisan is képes terjedni[23].

Egy következő spanyolországi tanulmányban is írtak a pB1000- plazmidról[25]. Ez a plazmid a *bla*_{ROB-1}-nevű β -laktamáz rezisztenciagént hordozza. Beszámoltak a pB1000 - plazmid jelenlétéről a humán fertőzéseket okozó *Haemophilus influenzae* spanyolországi kórházakból gyűjtött klinikai izolátumaiban. Konjugációs és transzformációs kísérleteket végeztek, és az eredmények szerint ezt a plazmidot konjugációval és transzformációval is át lehet vinni *H. influenzae*-ba, és cefaklórral, valamint ampicillinnel szembeni rezisztenciát biztosít abban. Bizonyították hogy a plazmid jelenléte a *H. influenzae*-ban nem a klonális elszaporodás eredménye. Az adatok megerősítik a pB1000 fajok közötti terjedését a Pasteurellaceae családon belül. A kísérletek alapján úgy látják, hogy a pB1000 - plazmid alkalmazkodott a Pasteurellaceae családhoz, és képes a családon belül elterjedni. Az egyetlen faj a Pasteurellaceae családból, amely széles gazdaspektruma révén számos állatfajban, valamint emberben is képes fertőzést okozni, a *P. multocida*. Ezért azt

valószínűsítik, hogy a *P. multocida* képes a Pasteurellaceae család állatokhoz, valamint az emberhez adaptált tagjai (például a *H. influenzae*) között szállítani a pB1000 plazmidot. A járványtani adatok, valamint az állati és humán törzsekből izolált pB1000 plazmidok nukleotid szekvenciái is arra utalnak, hogy a Pasteurellaceae családba tartozó, állatokból izolált baktériumtörzsek antimikrobiális rezisztencia rezervoárként működnek, és a *H. influenzae* képes ezen baktériumoktól rezisztencia géneket szerezni.

Kísérleteket végeztek a pB1000 plazmid fitness (rátermettség) költségének a megállapítására is két *H. influenzae* törzs között, amelyek genetikailag azonosak voltak, annyi volt közöttük a különbség hogy egyikük hordozta a pB1000 plazmidot, míg a másik nem. Egy kísérletben 12 órán át vizsgálták a két törzs növekedési erélyét antibiotikum hiányában, azaz szelekciós nyomás nélkül. Nem találtak különbséget a növekedési kinetikában. Egy másik kísérletben a pB1000 60 generáció után is megtalálható volt *H. influenzae*-ban és *P. multocidában* is, antimikrobiális szelekciós nyomás nélkül. A következő kísérlet viszont egy versenykísérlet volt, 9 napon át, 24 óránként oltottak át a két törzs keverékéből 2×10^6 CFU-nak megfelelő baktériumot, friss, szintén antibiotikum mentes, leves táptalajba. Ez pontosabban méri a fitness-t, mert a kísérlet több egymás utáni cikluson keresztül, a baktériumok növekedési ciklusának mindegyik szakaszában zajlik, így a versenyhátrány jobban érvényesülhet. A 2. naptól kezdve a pB1000-et hordozó törzs aránya egyre csökkent, a 9. napra pedig egyik vizsgált baktériumtelep sem tartalmazott pB1000-plazmidot. Ez az erős versenyhátrány adhat magyarázatot arra, hogy a *H. influenzae*-ban miért egy másik gén, a bla_{TEM-1} β-laktamáz gén okozza jóval gyakrabban a β-laktám rezisztenciát világszerte. A humán *H. influenzae* fertőzésben az elsődlegesen választott gyógyszerek a β-laktám antibiotikumok, ezért nagy jelentősége van a velük szembeni rezisztenciának [25].

5.4.5 Az ICEPmu1, egy multirezisztenciát biztosító integratív és konjugatív elem *P. multocida*-ban:

Szarvasmarhák légúti fertőzéseiből multirezisztens *P. multocida* törzseket azonosítottak. Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat leves-mikrohígítási módszerrel végezték el. Ezen törzsek a legtöbb, állatgyógyászatban használt antibiotikum osztállyal szemben rezisztensek voltak. Az egyik törzs (a *P. multocida* 36950-nevű törzs) kromoszomális DNS-ének teljes szekvenálásával, a kromoszómában találtak egy ICE-t, melyet ICEPmu1-nek neveztek el. Az ICEPmu1-ben 12 db rezisztenciagént azonosítottak. Ezen rezisztencia gének rezisztenciát biztosítanak szulfonamidok, gentamicin, sztreptomycin, spektinomycin, neomicin, kanamicin, tetraciklin, tulatromicin, tilmikozin, klindamicin, florfenikol és klóramfenikol antibiotikumok ellen. A törzs rezisztens volt enrofloxacinra is. Ezek mellett tartalmazott egy bla_{OXA-2} – rezisztenciagént is. Ez a β -laktamáz kódoló gén valamiért mégsem biztosít rezisztenciát ennek a törzsnek β -laktám antibiotikumokkal szemben. Ezek a gének két különálló rezisztenciagén-régióban helyezkedtek el az ICE-n belül. Ez a megszekvenált törzs nem tartalmazott plazmidokat, 2005-ben izolálták, egy nebraskai szarvasmarhatelepről származik[26].

Ez az ICE integrálódik a *tRNS*^{Leu} -ba, és képes konjugációval átjutni *E. coli*-ba, *P. multocida*-ba, és *M. haemolytica*-ba is, ahogy azt konjugációs kísérletekkel igazolták. Ezen baktériumokban szintén a *tRNS*^{Leu} -t használja az integrálódásra, valamint a benne lévő antibiotikum rezisztencia gének funkcionálisan aktívak a recipiensekben[27].

Mivel az ICE Pmu1 könnyen terjed törzsek és nemzetségek között is, jelentős a kockázata ezen rezisztenciagének gyors terjedésének[27]. A két rezisztenciagén-régió elemzése által kimutatták, hogy a *P. multocida* képes átvenni egyéb Gram-negatív baktériumoktól antibiotikum rezisztenciagéneket, képes beépíteni azokat a kromoszómájába, és ezáltal antimikrobiális rezisztenciára szert tenni. Mivel egy ICE-n belül helyezkednek el ezek a gének, ez arra enged következtetni, hogy egy horizontális géntranszfer elég lehet több rezisztenciagén megszerzésére, és az antimikrobiális rezisztencia kialakítására[26]. Megállapították, hogy az ICE Pmu1- ben lévő antibiotikum rezisztencia gének nem a Pasteurellaceae, hanem az Enterobacteriaceae család tagjaiból származnak eredetileg[27].

A *P. multocida* 36950 - törzsben talált ICEPmu1 nagyon hasonlít egy *M. haemolytica* törzs ICE-szegmenséhez, és egy *H. somni* törzsből kimutatott ICE-hez, amely törzseket a *P. multocida* 36950- hoz hasonlóan szarvasmarha légúti megbetegedéseiből izolálták. Ez, és az

in vitro konjugációs kísérletek eredményei arra utalnak hogy in vivo már megtörtént az ICE-k átvitel ezen nemzetségek tagjai között. Ez a folyamat jelentősen nehezítheti a szarvasmarha légúti fertőzéseinek kezelését.[27]

5.4.6 A juhokból izolált *P. multocida* törzsek antibiotikum rezisztencia génjeiről szóló tanulmányok

Egy görögországi tanulmányban Görögország 8 különböző tartományából, különböző emlős állatfajok tüdőgyulladásos tüdő szövetmintáiból izolált 100 db *P. multocida* törzs tetraciklinre való rezisztenciáját, és tetraciklin rezisztencia génjeit vizsgálták. Az antibiotikum érzékenységet korongdiffúziós és leves-mikrohígítási módszerrel is vizsgálták. A 100 törzsből 18 volt rezisztens tetraciklinre, ezek a törzsek 128 µg/ml-nél magasabb MIC- értéket mutattak, és ebből 7 db törzs származott juhokból. A juhokból izolált 7 rezisztens törzs Görögország 6 különböző régiójából származott. A juhokból izolált törzsek tetH gént hordoztak. A tetH gén plazmidon és a kromoszómában is kódolva volt a törzsekben, egy törzs kivételével, amelyik csak plazmidon hordozta azt. A plazmidon és kromoszomális DNS-ben hordozott tetH gén arra utal, hogy transzponálódásra képes elemeken hordozzák őt a törzsek[28].

Egy 2018-ban megjelent indiai tanulmányban egy, *P. multocida* A- típusú törzset elemeztek. A törzset egy juh orrgaratjából vett tamponmintából izolálták, amelynek korábban súlyos légúti fertőzése volt. Ezt a törzset *P. multocida* A típusú NIVEDI/PMS-1-nek nevezték el. Ennek a törzsnek a teljes genomját szekvenálták, és elemezték. A törzs antibiotikum érzékenységét is vizsgálták in vitro, ami alapján penicillinnel szemben mutatott rezisztenciát. A törzs genomja 19 genomi szigetet (Genomic Island = GI) is tartalmazott. A 19 db GI szekvenciái nagyon hasonlóak voltak számos más baktériumtörzs genomi szigeteinek szekvenciáival, például: *Actinobacillus equuli* (GI2, GI5) *Haemophilus influenzae* (GI3, GI4, GI6, GI12, GI17), *Histophilus somni* (GI1, GI13, GI19)[15].

A *P. multocida* A típusú NIVEDI/PMS-1- törzs számos antibiotikum rezisztencia gént hordoz. A CARD segítségével azonosították a ciprofloxacín, fluorokinolon, klóramfenikol, szulfonamid, rifampicin, sztreptomycin, tetraciklin, és trimetoprim rezisztencia génjeit a

törzs genomjában. A szulfonamid rezisztenciát biztosító, dihidropteroát szintázt kódoló sul2 gént antibiotikum-rezisztencia gén markerekkel azonosították.

A GI-ken lévő járulékos gének fontos tulajdonságokat kódolnak a baktériumok számára. Horizontális géntranszferrel terjednek. Szerepet játszanak a baktériumok környezetükhöz való alkalmazkodóképességében, és a patogének megbetegítő képességében is.

A vizsgált baktériumtörzs GI- jeinek szekvenciái hasonlóak voltak egyéb légzőszervi kórképeket okozó baktériumok szekvenciáival, főleg a Pasteurellaceae családon belül. Ez horizontális géntranszferre utal a juhok légzőszervrendszerén belül a Pasteurellaceae család fajai között.

A CARD segítségével megtalálták a dihidrofolát-reduktáz enzim, a dihidropteroát szintáz enzim és a klóramfenikol acetiltranszferáz enzimek génjeit, amelyek a trimetoprim, a szulfonamid, és a klóramfenikol rezisztenciáért felelősek, a *P. multocida* A típusú NIVEDI/PMS-1- törzsben[15].

6 Célkitűzések/kérdések

A vizsgálataink célja volt, hogy felmérjük a Magyarország különböző pontjairól gyűjtött juhok légzőszervi mintáiból származó *Pasteurella multocida* törzsek antibiotikum érzékenységét leves-mikrohígítási módszerrel és korongdiffúziós módszerrel, és a két módszerrel nyert értékeket összehasonlítsuk.

7 Anyag és módszer

7.1.1 A vizsgált anyag

A térképen a vizsgált törzsek származási helyét jelöltem. (1. ábra). A vizsgált törzsek eredetét a 9. táblázatban jelöltem. A vizsgált törzsek megoszlását az izolálás helye szerint a 10. táblázatban jelöltem. A vizsgált törzsek tüdőből, hörgőből, valamint orrtampon mintákból származtak.



1.ábra

A vizsgált törzsek származási helyei. Amelyik helyről több törzs is származott, ott feltüntettem a darabszámot. Ahol nincs feltüntetve szám, onnan egy törzset vizsgáltunk. : Almáskeresztúr, Csapod, Füzesabony, Gomba, Gyula(2db), Hajdúnánás, Harkakötöny, Harta, Hetvehely, Iregszemcse, Jánoshalma(3db), Kaposmérő, Kiskunfélegyháza, Kiskunhalas, Kiskunlacháza, Lakitelek, Magyarszék, Nyárlőrinc(2db), Pomáz, Somogyvár, Szokolya.

9. táblázat

A vizsgált törzsek eredete:

Vágóhídi mintavétel	12 db
ÁDI, Budapest diagnosztikai minta	11 db
ÁDI, TSE minta	2db
Összesen	25 db

10. táblázat

A vizsgált törzsek megoszlása az izolálás helye szerint

tüdő	17 db
hörgő	5 db
orrtampon	2 db
tüdő tályog	1db
Összesen	25 db

Ha a vágóhídra közvetlenül a tartási helyükről szállították be és vágták le a juhokat, akkor a származási helyükként a tartási helyüket adtuk meg, viszont ha hízlaldából kerültek be a vágóhídra, akkor a hízlaldát adtuk meg mint származási helyet. Az állatok hízlalda előtti származási helye már nem mindig nyomon követhető, emellett a hízlaldában töltött hetek-hónapok alatt az egyes baktériumtörzsek átjutnak egyik állatról a másikra, keverednek, így az izolált törzsek összetétele már nem tükrözi az eredeti tartási helyükön előforduló törzsek összetételét.

A vizsgált *P. multocida* baktériumtörzsek juhok légzőszervi mintáiból lettek izolálva, klinikai tüneteket mutató, valamint tünetmentes állatokból származó törzseket is vizsgáltunk. A minták véres agarra és MacConkey agarra lettek kiszélesztve, és a telepmorfológiájuk, és elsődleges (kataláz, oxidáz és OF teszt) valamint másodlagos biokémiai tulajdonságaik (indol termelés, ureáz teszt, cukorbontások (glükóz, laktóz, maltóz, mannit, trehalóz) alapján lettek azonosítva.

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat friss, véres agaron 24 órán át inkubált tenyészetekkel végeztük, összesen 25 törzset vizsgáltunk. Az általam választott 11 antibiotikum mindegyikével elvégeztem a korongdiffúziós és a leves-mikrohígításos módszert is.

7.1.2 Korongdiffúziós módszer

Az antibiotikum érzékenység meghatározására használt korongdiffúziós módszer kevésbé pontos, mint a leves-mikrohígításos módszer. Viszont a gyakorlati célokra, egyszerű antibiogram meghatározásra, ez a módszer praktikusabb a leves-mikrohígításos módszernél, mert lényegesen egyszerűbb, kevesebb ideig tart elvégezni és leolvasni is az eredményt.

Ez a módszer szemikvantitatív, a pontos MIC értéket nem lehet meghatározni, de relatív módon látjuk a gátlási zóna átmérőjéből, hogy a baktérium törzs az egyik antibiotikumra jobban vagy kevésbé érzékeny-e, mint a másokra. Az antibiotikum korongok körül kör alakú gátlási zónák jöhetnek létre, amelyek nagysága arányos az érzékenységgel, és ezek átmérőjét vonalzóval mérjük le, milliméter pontossággal. Az egyes baktériumfajokra állatfajok szerint meg vannak határozva a határértékek, hogy a baktériumfajok az egyes antibiotikumok esetén mekkora gátlási zóna mellett számítanak rezisztensnek az adott antibiotikumra. Így az eredmények alapján megkülönböztethetünk rezisztens, mérsékelt rezisztens, vagy érzékeny törzseket.

A korongdiffúziós vizsgálatához Mueller-Hinton agar táptalajokat használtunk. Ez az agar egy külön, az antibiotikum érzékenység vizsgálatára kifejlesztett, szilárd táptalaj. Ahhoz hogy reprodukálható legyen az eredmény, az agar elkészítését pontosan az előírások szerint kell elvégezni. Állandó koncentrációban tartalmaz Ca^{2+} és Mg^{2+} - ionokat, ez egyes antibiotikumok gátlási zóna átmérőjét befolyásolja, a szokásosnál kisebb koncentrációban tartalmaz agart, emiatt jobban diffundálnak benne az antibiotikumok. Keményítőt is tartalmaz, ami megköti a baktériumok által termelt toxinokat, amelyek így nem lépnek kölcsönhatásba az antibiotikumokkal. Steril juhvérrrel is ki lett egészítve, ez a pasteurellák növekedése miatt fontos, mivel ezek tápigényesek. Fontos az agar szabványos vastagsága is, melynek a Petri csésze közepén 4 mm értéket kell elérnie[29].

Az egyes antibiotikum korongokon lévő jelölések alapján a korongokban lévő antibiotikumok mennyiségét a 11. táblázatban jelöltem.

11. táblázat

Az antibiotikum korongokban lévő antibiotikumok mennyisége

Antibiotikumok	antibiotikum tartalom/korong (mikrogramm)
oxitetraciklin	30
enrofoxacin	5
amoxicillin	25
florfenikol	30
gentamicin	30
szulfametoxazol+trimetoprim	25
ceftiofur	30
tiamulin	30
tulatromicin	30
tilmikozin	15
penicillin	10

A vizsgálat során 5-6 közepes telepet vettem le steril bakteriológiai kaccsal az agarról, ezt 3 ml steril fiziológiás sóoldatba mostam bele, majd vortexszel homogenizáltam. 0,5 MacFarland–nek megfelelő zavarosság elérése volt a cél, mivel a beoltott inokulum koncentrációja és mennyisége befolyásolja az eredményt. Ezután a szuszpenzióba steril mintavevő tampont merítettem, majd 5-10 másodperc után, miután megszívta magát nedvességgel, a tamponnal úgy oltottam be a lemezt, hogy egyenletesen, a lemez egész felületére jussanak a baktériumok. Ezután a lemezre csipesszel ráhelyeztem, kissé rányomtam az antibiotikumokat tartalmazó korongokat, munka közben a csipeszt leégetéssel sterilizáltam. Egy lemezre maximum 5-6 korong kerülhet, fontos hogy ne kerüljenek túl közel egymáshoz, mert akkor a gátlási zónák egymásba érhetnek. 24 órás, 37 °C-os inkubáció után olvastam le az eredményt. Amennyiben az antibiotikum gátolta a baktériumok növekedését, a korong körül gátlási zónák jöttek létre, és ezek átmérőjét vonalzóval le tudtam olvasni[30].

7.1.3 A MIC- érték meghatározása leves-mikrohígítási módszerrel:

A MIC érték meghatározást 96 lyukú lemezekon végeztem. Ennek lyukaiba a következő oldatok keverékét mértem be: 1.) A táptalaj, 2.) Az antibiotikum oldat munkahígításban, és 3.) A baktérium szuszpenzió.

1.) A táptalaj kation kiegészített MH leves volt. Ezt úgy állítottam elő, hogy 100 ml MH levesbe bemértem 0,19 ml Ca^{2+} és 0,081 ml Mg^{2+} törzsoldatot. (A törzsoldatok előállításához: 3,68 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ -t kell feloldani 100 ml deionizált vízben, és 8,36 g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ -t kell feloldani 100 ml deionizált vízben.)

2.) Az antibiotikum oldat munkahígításban. Megelőzőleg törzsoldatokat készítettünk, melyeket -20°C -on fagyasztva tároltunk. A munkahígítású antibiotikum oldatokat úgy állítottam elő, hogy felolvastottam a fagyasztott antibiotikum törzsoldatokat, és például amoxicillin, tilmikozin, oxitettraciklin esetén 100 μl törzsoldatot mértem be 5 ml kationkiegészített MH-táptalajba, kémcsövekbe. Ezek az arányok antibiotikumonként különbözhetnek.

3.) A baktérium szuszpenzió előállítása során kémcsőben 4 ml fiziológiás sóoldatba 2 telepnyi *P. multocida* baktériumot tettem egy leégetett fémkacsal, és vortexszel elkevertem. A cél azonos koncentrációjú baktériumszuszenziók előállítása volt. A baktériumszuszenziók koncentrációját csíraszámlálással ellenőriztem, leveshígítási módszerrel.

A leves-mikrohígítási módszert steril fülkében végeztem. A 96 lyukú lemezeket feliratoztam, majd a lemez minden csövébe osztott pipettával bemértem 50 μl kationkiegészített MH leves táptalajt. Majd az első oszlopban lévő csövekbe bemértem 50 μl antibiotikum oldatot munkahígításban. Ezután egészen a 11. oszlopig felező hígítást végeztem, mindig 50 μl oldatot vittem tovább a következő csőbe, és mindig 3-4 szer felszívtam majd visszanyomtam az oldatot a csövekben, ezzel elkeverve azt. Amikor végeztem a 11. csővel, nem vittem tovább a 12. csőbe az oldatot, hanem a 12. oszlopot kontrollként meghagytam, a kontroll csövekbe nem került antibiotikum. Ezután a lemezen lévő minden csőbe bemértem 50 μl baktérium szuszpenziót, majd lefedtem a lemezeket, és 24 óráig, 37°C -on inkubáltam őket termosztátban. A baktériumok, amennyiben nem gátolja őket az adott koncentrációban jelenlévő antibiotikum oldat, megzavarosítják a

táplevest. A leves zavarossága a rajta áteső fény abszorbanciájával arányos, így ELISA olvasóval mérhető.

Az eredményeket ELISA leolvasóval olvastam le, 450 nm hullámhosszon. Az ELISA olvasó megmérte az egyes csövek abszorbanciáját, azt hogy mennyire lett zavaros az oldat a baktériumok növekedésétől. A MIC érték az a legkisebb antibiotikum koncentráció lett, ahol az antibiotikum a baktériumok növekedését még gátolni tudta[5]. Az antibiotikum koncentrációját µg/ml-ben, példaként, oxitetraciklin esetében a 12. táblázatban jelöltem. Az alkalmazott antibiotikumok kezdő és vég koncentrációit a 13. táblázatban jelöltem.

12. táblázat

Az oxitetraciklin koncentrációja µg/ml-ben, a különböző hígításokban. A kontroll cső nem tartalmazott antibiotikumot.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	kontroll

13. táblázat

Az alkalmazott antibiotikumok kezdő és vég koncentrációi:

a felhasznált antibiotikumok	kezdő koncentráció (µg/ml)	végkoncentráció: (µg/ml)
oxitetraciklin	64	0,06
enrofoxacin	8	0,0075
amoxicillin	64	0,06
florfenikol	64	0,06
gentamicin	128	0,125
szulfametoxazol+trimetoprim	608/32	0,594/0,03
ceftiofur	32	0,03
tiamulin	256	0,25
tulathromicin	256	0,25
tilmikozin	256	0,25
penicillin	64	0,06

A baktériumszuszenziók koncentrációjának ellenőrzéséhez tízes alapú hígítási sort készítettem, törzsenként 5 kémcsőben. Az első csőbe 4,95 ml steril fiziológiás sóoldatot mértem, a 2., 3., 4., és 5. kémcsővekbe pedig 4,5 ml steril fiziológiás sóoldatot. Az első kémcsőbe belemostam pipettával 0,05 ml (=50 µl) baktérium szuszenziót, majd pedig pipettával 0,5 ml-t mértem az 1. csőből a 2.-ba, majd a 2.-ból a 3.ba, és így tovább az 5.-ig. Így 10-es alapú hígítási sort kapunk, a 2. csőben tizedannyi a csíraszám, mint az elsőben, a 3.-ban tizedannyi, mint a 2.-ban, és így tovább. Ezután mindegyik csőből 50 µl oldatot pipettáztam egy agar lemezre, majd egy meghajlított végű üvegbottal egyenletesen eloszlattam őket az agar felületén. Az üvegbotot az egyes lemezek között alkoholba mártottam, majd leégettem róla az alkoholt, ezzel sterilizálva azt. 24 óras, 37 °C-os tenyésztés után értékeltem az eredményt. Csak azt a lemezt értékeltem ahol a telepszám 30 és 300 között volt. A csíraszám-lálással meghatározott CFU- értékekből megtudhatjuk, hogy megfelelő koncentrációban tartalmazznak-e baktériumot a baktérium-szuszenziók. *P. multocida* esetén a baktériumszuszenziók átlagos koncentrációja $1,325 \times 10^7$ CFU/ml volt.

7.1.4 Az eredmények validálása

2 törzset használtam mind a korongdiffúziós módszerrel mind a leves-mikrohígításos módszerrel kapott eredmények validálására, az ATCC29213 *Staphylococcus aureus*- törzset, és az ATCC25922 *E. coli*- törzset. Az általam e két törzsre megállapított gátlási zóna értékek és MIC-értékek minden esetben a CLSI-könyvben [31] megadott standard határértékeken belül voltak. A *Staphylococcus aureus* törzs esetében hiányoztak a könyvben megadott standard értékek a korongdiffúziós próbánál. Az átlagos csíraszám az ATCC29213 *Staphylococcus aureus*-törzs esetében $3,25 \times 10^6$ CFU/ml, az ATCC25922 *E. coli* törzs esetén pedig $1,125 \times 10^7$ CFU/ml volt[30].

Az általam használt MIC- és gátlási zóna határértékeket a *P. multocidára* vonatkozóan a forrásaikkal együtt a 14. táblázatban jelöltem.

14. táblázat

A MIC- és gátlási zóna határértékek a forrásokkal együtt *P. multocidánál*

	MIC határértékek (µg/ml)			A MIC határértékek forrásai	Korong gátlási zónák (milliméter)			A gátlási zónák forrásai
	Érzékeny	Közepesen érzékeny	Rezisztens		Érzékeny	Közepesen érzékeny	Rezisztens	
	S ≤	I	R ≥		S ≥	I	R ≤	
oxitetraciklin	2	4	8	[31]	19	15-18	14	[7]
enrofoxacin	0,25	0,5-1	2	[31]	21	17-20	16	[31]
amoxicillin	1	-	1	[32]	18	14-17	13	[33]
florfenikol	2	4	8	[31]	19	15-18	14	[31]
gentamicin	4	8	16	[34]	15	13-14	12	[33]
szulfametoxazol +trimetoprim	0,25 (trimetoprim)	-	0,25 (trimetoprim)	[32]	23	-	23	[32]
ceftiofur	2	4	8	[31]	21	18-20	17	[31]
tiamulin	4	-	32	[35]	19	-	11	[35]
tulatromicin	16	32	64	[31]	18	15-17	14	[31]
tilmikozin	8	-	32	[36]	11	-	10	[10]
penicillin	0,25	0,5	1	[31]	29	-	28	[7]

8 Eredmények

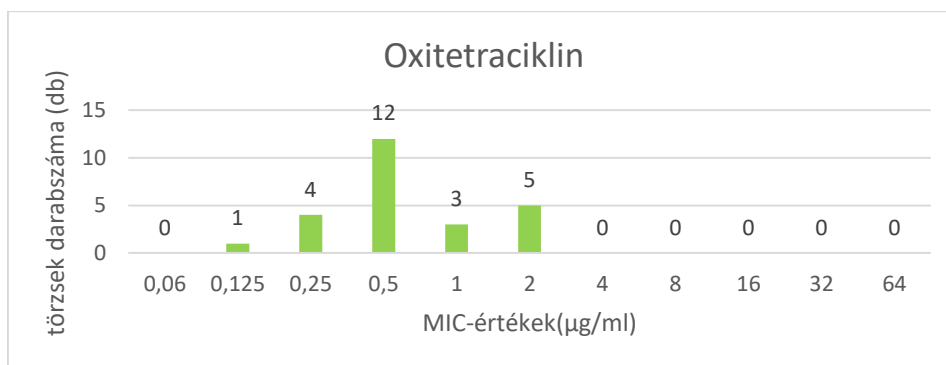
Oxitetraciklin

Oxitetraciklinre mindegyik vizsgált törzsünk érzékeny volt, mind a leves-mikrohígítási módszerrel meghatározott MIC értékek, mind a korongdiffúziós próbák alapján. A MIC₅₀-értéke 0,5 µg/ml, a MIC₉₀-értéke pedig 2 µg/ml volt oxitetraciklinnél. A MIC₅₀-érték azt a legkisebb antibiotikum koncentrációt jelenti, amely a baktériumtörzsek felét képes gátolni, míg a MIC₉₀- az a legkisebb koncentráció, amely a törzsek 90%-ának növekedését gátolja. A leves-mikrohígítási módszerrel kapott eredményeket a 15. táblázatban és a 2. ábrán jelöltem.

15. táblázat

A leves-mikrohígítási módszerrel kapott eredmények oxitetraciklin esetén

Oxitetraciklin											
MIC-értékek(µg/ml)	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
törzsek darabszáma(db)	0	1	4	12	3	5	0	0	0	0	0
	érzékeny (25 db)						közepesen érzékeny (0 db)	rezisztens (0 db)			
	összesen 25 db										



2. ábra

A leves-mikrohígítási módszerrel kapott eredmények oxitetraciklin esetén

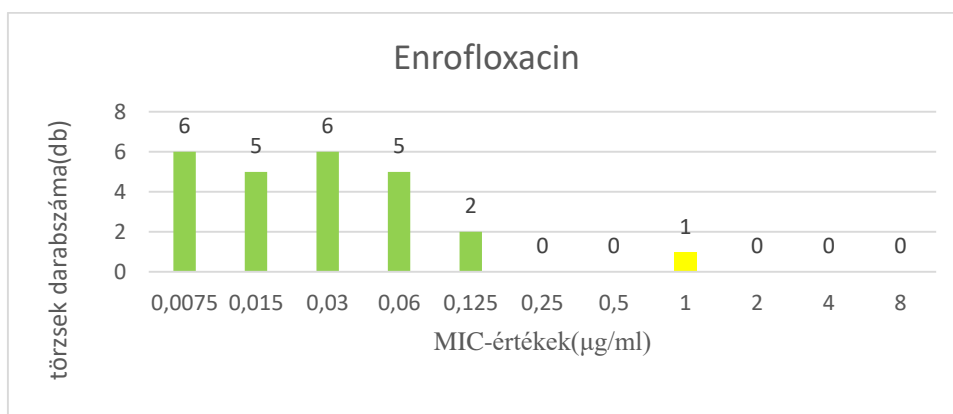
Enrofloxacin

A MIC értékek alapján enrofloxacinra egy törzs mutatott közepes érzékenységet, a többi törzs érzékeny volt. (16. táblázat, 3. ábra) Korongdiffúziós próbával mindegyik törzs érzékenységet mutatott. A MIC₅₀-értéke 0,03 µg/ml, a MIC₉₀-értéke pedig 0,125 µg/ml volt enrofloxacin esetén.

16. táblázat

A leves-mikrohígítási módszerrel kapott eredmények enrofloxacin esetében

Enrofloxacin											
MIC-értékek(µg/ml)	0,0075	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
törzsek darabszáma(db)	6	5	6	5	2	0	0	1	0	0	0
	érzékeny (24 db)						közepesen érzékeny (1 db)		rezisztens (0 db)		
	Összesen 25 db										



3. ábra

A leves-mikrohígítási módszerrel kapott eredmények enrofloxacin esetében

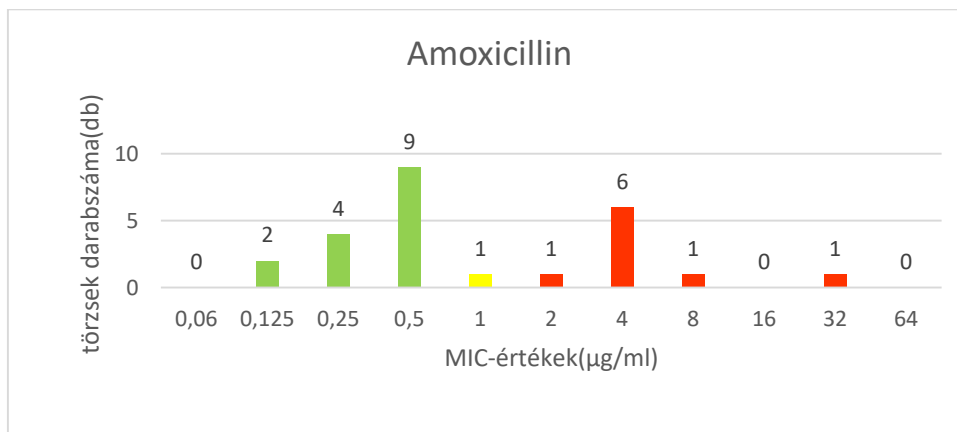
Amoxicillin

Amoxicillinnél a MIC értékek alapján 9 törzs volt rezisztens, 1 törzs bizonyult közepesen érzékenynek, 15 törzs pedig érzékenységet mutatott (17. táblázat, 4. ábra). A korongdiffúziós próba alapján valamennyi törzs érzékeny volt. A MIC₅₀-értéke 0,5 µg/ml, a MIC₉₀-értéke pedig 4 µg/ml volt.

17. táblázat

A leves-mikrohígítási módszerrel kapott eredmények amoxicillin esetén

Amoxicillin											
MIC-értékek(µg/ml)	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
törzsek darabszáma(db)	0	2	4	9	1	1	6	1	0	1	0
	érzékeny (15 db)				közepesen érzékeny (1 db)	rezisztens (9 db)					
	Összesen 25 db										



4. ábra

A leves-mikrohígítási módszerrel kapott eredmények amoxicillin esetében

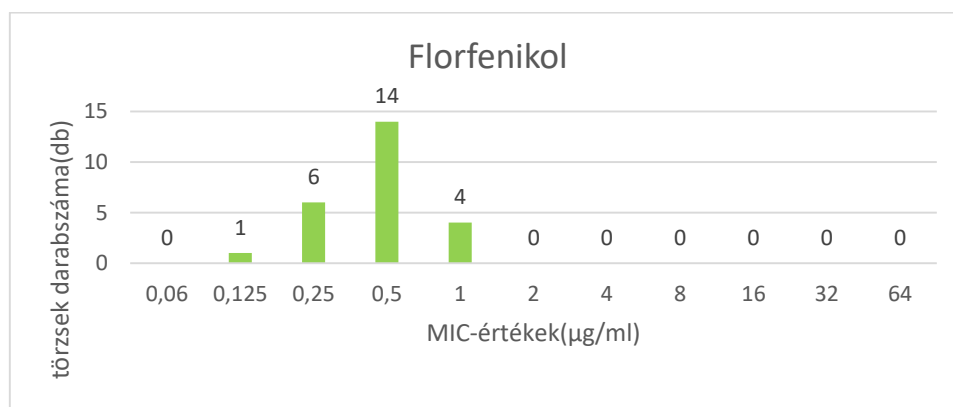
Florfenikol

Florfenikol esetében minden törzsünk érzékeny volt a megállapított MIC-értékek és a korongdiffúziós próbák alapján is. A MIC₅₀-értéke 0,5 µg/ml, a MIC₉₀-értéke pedig 1 µg/ml volt. A leves-mikrohígításos módszerrel kapott eredményeket a 18. táblázatban és az 5. ábrán jelöltem.

18. táblázat

A leves-mikrohígításos módszerrel kapott eredmények florfenikol esetében

Florfenikol											
MIC-értékek(µg/ml)	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
törzsek darabszáma(db)	0	1	6	14	4	0	0	0	0	0	0
	érzékeny(25 db)						közepesen érzékeny (0 db)	rezisztens (0 db)			
	Összesen 25 db										



5. ábra

A leves-mikrohígításos módszerrel kapott eredmények florfenikol esetében

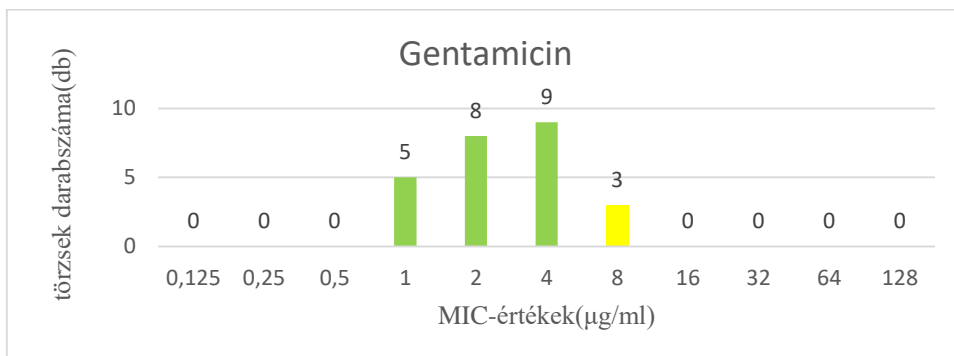
Gentamicin

Gentamicin esetében a MIC-értékek alapján 25 törzsből 3 volt mérsékelten érzékeny, a többi mind érzékeny volt (19. táblázat, 6. ábra). A korongdiffúziós próbával mindegyik törzs érzékenynek bizonyult. A MIC₅₀-értéke 2 µg/ml, a MIC₉₀-értéke pedig 8 µg/ml volt.

19. táblázat

A leves-mikrohígításos módszerrel kapott eredmények gentamicin esetében

Gentamicin											
MIC-értékek(µg/ml)	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
törzsek darabszáma(db)	0	0	0	5	8	9	3	0	0	0	0
	érzékeny (22 db)						közepesen érzékeny (3 db)	rezisztens (0 db)			
	Összesen 25 db										



6. ábra

A leves-mikrohígításos módszerrel kapott eredmények gentamicin esetében

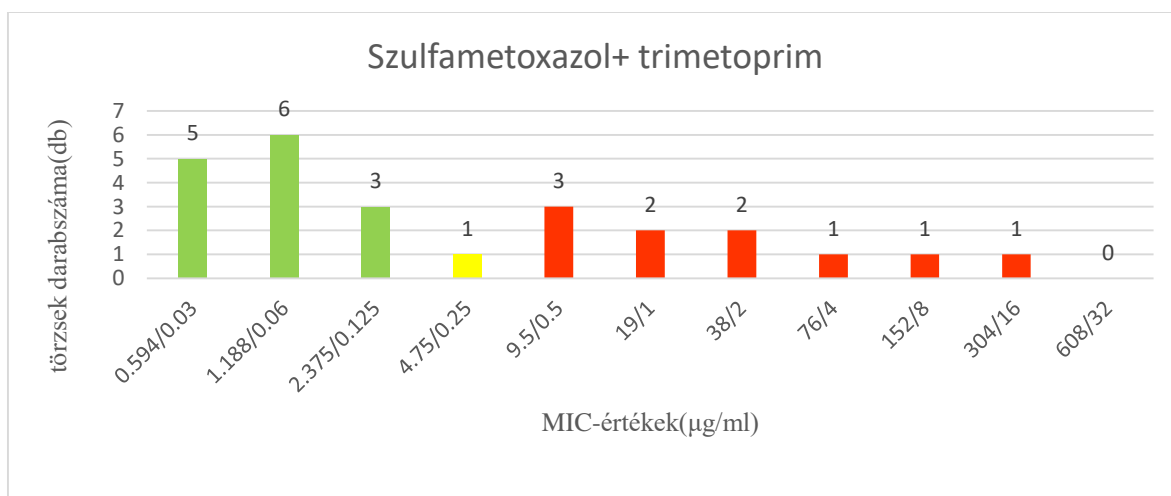
Szulfametoxazol+trimetoprim

Szulfametoxazol+trimetoprim- nál a MIC-értékek szerint 14 törzs volt érzékeny, 1 törzs volt mérsékelten érzékeny, 10 törzs pedig rezisztens (20. táblázat, 7. ábra). Korongdiffúziós próbával 18 törzs volt érzékeny, 7 pedig rezisztens. A MIC₅₀-értéke 2,375/0,125 µg/ml, a MIC₉₀-értéke pedig 76/4 µg/ml volt.

20. táblázat

A leves-mikrohígítási módszerrel kapott eredmények szulfametoxazol+trimetoprim esetében

Szulfametoxazol+trimetoprim											
MIC-értékek(µg/ml)	0,594 /0,03	1,188 /0,06	2,375 /0,125	4,75 /0,25	9,5 /0,5	19 /1	38 /2	76 /4	152 /8	304 /16	608 /32
törzsek darabszáma(db)	5	6	3	1	3	2	2	1	1	1	0
	érzékeny (14 db)			közepesen érzékeny (1 db)	rezisztens (10 db)						
	Összesen 25 db										



7. ábra

A leves-mikrohígítási módszerrel kapott eredmények szulfametoxazol+trimetoprim esetében

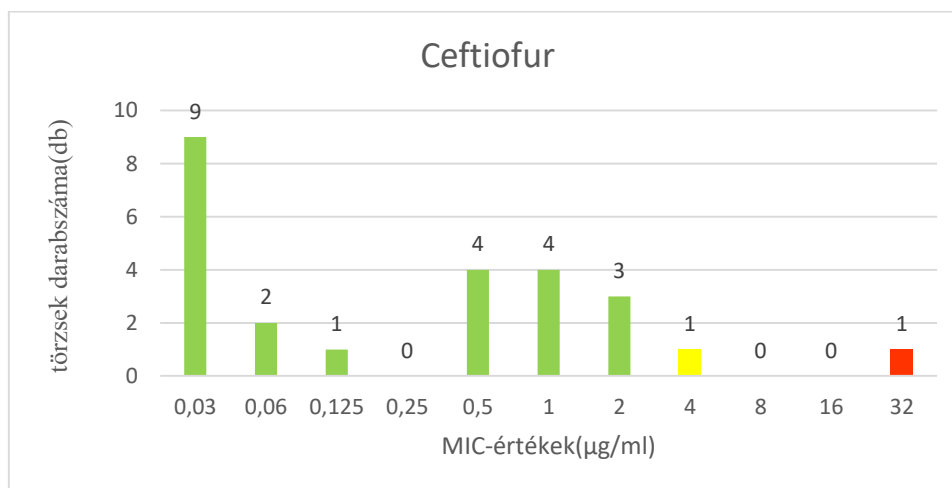
Ceftiofur

Ceftiofur esetében a MIC-értékek szerint egy rezisztens, és egy közepesen érzékeny törzs volt, a többi érzékeny volt (21. táblázat, 8. ábra). Korongdiffúziós próbával mindegyik törzs érzékenynek bizonyult. A MIC₅₀-értéke 0,5 µg/ml, a MIC₉₀-értéke pedig 2 µg/ml volt.

21. táblázat

A leves-mikrohígítási módszerrel kapott eredmények ceftiofur esetében

Ceftiofur											
MIC-értékek(µg/ml)	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
törzsek darabszáma (db)	9	2	1	0	4	4	3	1	0	0	1
	érzékeny (23 db)							közepesen érzékeny (1 db)	rezisztens (1 db)		
	Összesen 25 db										



8. ábra

A leves-mikrohígítási módszerrel kapott eredmények ceftiofur esetében

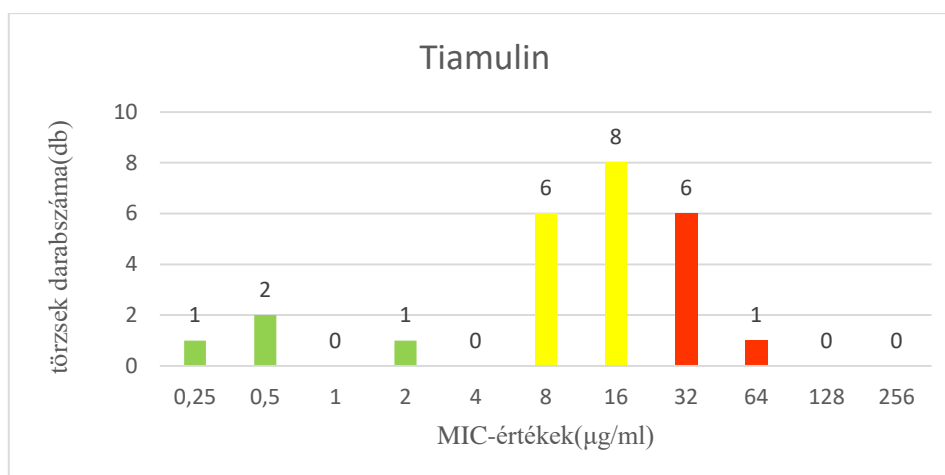
Tiamulin

A megállapított MIC-értékek szerint 4 törzs volt érzékeny, 14 db volt közepesen érzékeny, és 7 bizonyult rezisztensnek tiamulinra (22. táblázat, 9. ábra). Korongdiffúziós próbával 11 törzs volt érzékeny, és 14 törzs volt mérsékelten érzékeny. A MIC₅₀-értéke 16 µg/ml, a MIC₉₀-értéke pedig 32 µg/ml volt.

22. táblázat

A leves-mikrohígítási módszerrel kapott eredmények tiamulin esetében

Tiamulin											
MIC-értékek(µg/ml)	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
törzsek darabszáma (db)	1	2	0	1	0	6	8	6	1	0	0
	érzékeny (4 db)					közepesen érzékeny (14 db)		rezisztens (7 db)			
	Összesen 25 db										



9. ábra

A leves-mikrohígítási módszerrel kapott eredmények tiamulin esetében

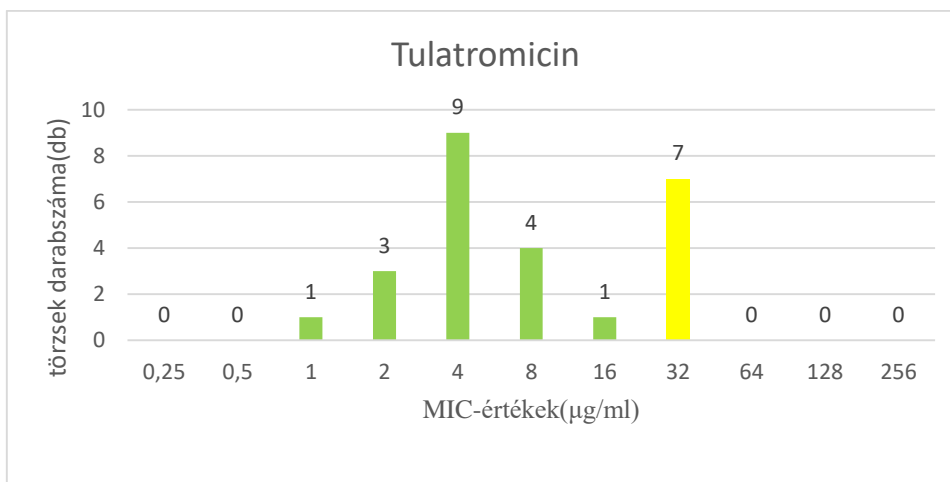
Tulatromicin

Tulatromicin esetén 18 törzs volt érzékeny, míg 7 törzs volt közepesen érzékeny a MIC-értékei alapján (23. táblázat, 10. ábra). Korongdiffúziós próbával mindegyik törzs érzékenynek bizonyult. A MIC₅₀-értéke 4 µg/ml, a MIC₉₀-értéke pedig 32 µg/ml volt.

23. táblázat

A leves-mikrohígítási módszerrel kapott eredmények tularromicin esetében

Tulatromicin											
MIC-értékek(µg/ml)	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
törzsek darabszáma (db)	0	0	1	3	9	4	1	7	0	0	0
	érzékeny (18 db)							közepesen érzékeny (7 db)	rezisztens (0db)		
	Összesen 25 db										



10. ábra

A leves-mikrohígítási módszerrel kapott eredmények tularromicin esetében

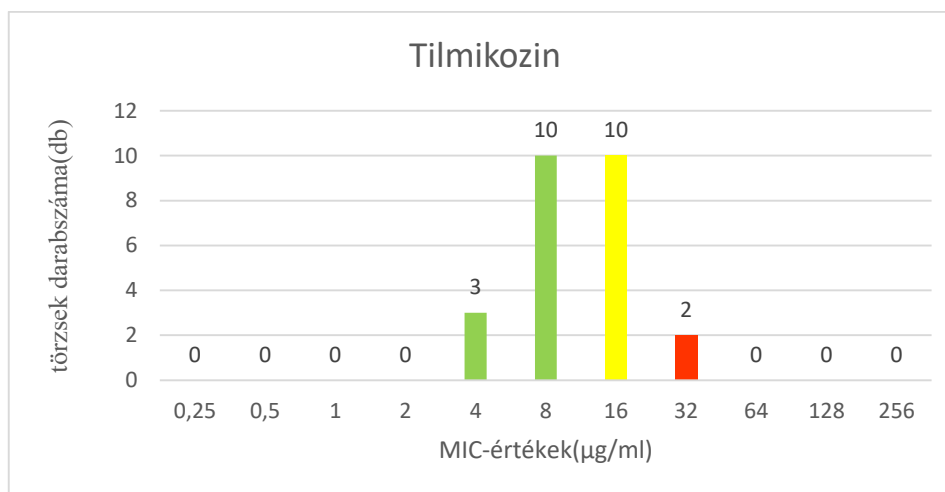
Tilmikozin

Tilmikozinra a MIC-értékek alapján 13 törzs volt érzékeny, 10 törzs mérsékelten érzékeny, míg 2 törzs rezisztens (24. táblázat, 11. ábra). A korongdiffúziós próba alapján viszont mindegyik törzs érzékeny volt. A MIC₅₀-értéke 8 µg/ml, a MIC₉₀-értéke pedig 16 µg/ml volt.

24. táblázat

A leves-mikrohígítási módszerrel kapott eredmények tilmikozin esetében

Tilmikozin											
MIC-értékek(µg/ml)	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
törzsek darabszáma (db)	0	0	0	0	3	10	10	2	0	0	0
	érzékeny (13 db)						közepesen érzékeny (10 db)	rezisztens (2 db)			
	Összesen 25 db										



11. ábra

A leves-mikrohígítási módszerrel kapott eredmények tilmikozin esetében

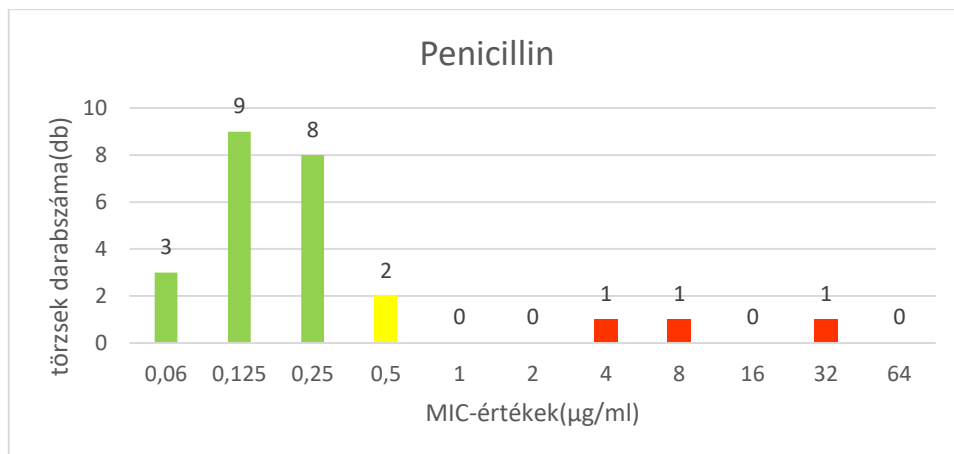
Penicillin

Penicillin esetében 20 törzs volt érzékeny, 2 törzs közepesen érzékeny, míg 3 rezisztens törzs volt a MIC-értékek alapján (25. táblázat, 12. ábra). Korongdiffúziós próbával 2 rezisztens törzs volt, a többi érzékenynek bizonyult. A MIC₅₀-értéke 0,25 µg/ml, a MIC₉₀-értéke pedig 4 µg/ml volt.

25. táblázat

A leves-mikrohígítási módszerrel kapott eredmények penicillin esetében

Penicillin											
MIC-értékek(µg/ml)	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
törzsek darabszáma (db)	3	9	8	2	0	0	1	1	0	1	0
	érzékeny (20 db)			közepesen érzékeny (2 db)	rezisztens (3 db)						
	Összesen 25 db										



12. ábra

A leves-mikrohígítási módszerrel kapott eredmények penicillin esetében

Az egyes antibiotikumok esetén mért legkisebb és legnagyobb MIC értékeket, az antibiotikumok MIC50 és MIC90 értékeit, valamint a móduszt (a leggyakoribb elemet) a 26. táblázatban jelöltem.

26. táblázat

Az egyes antibiotikumok esetén mért legkisebb és legnagyobb MIC értékek (a kettő közötti a MIC range), a MIC₅₀, MIC₉₀ értékek, valamint a módusz

a felhasznált antibiotikumok	legkisebb mért MIC érték (µg/ml)	legnagyobb mért MIC érték (µg/ml)	MIC50 (µg/ml)	MIC90 (µg/ml)	módusz (µg/ml)
oxitetraciklin	0,125	2	0,5	2	0,5
enrofoxacin	0,0075	1	0,03	0,125	0,0075 és 0,03
amoxicillin	0,125	32	0,5	4	0,5
florfenikol	0,125	1	0,5	1	0,5
gentamicin	1	8	2	8	4
szulfametoxazol+ trimetoprim	0,594/0,03	304/16	2,375/0,125	76/4	1,188/0,06
ceftiofur	0,03	32	0,5	2	0,03
tiamulin	0,25	64	16	32	16
tulatromicin	1	32	4	32	9
tilmikozin	4	32	8	16	8 és 16
penicillin	0,06	32	0,25	4	0,125

Az alábbi táblázatban a leves-mikrohígítási módszerrel és a korongdiffúziós módszerrel megállapított érzékenységet hasonlítottam össze (27. táblázat).

27. táblázat

A leves-mikrohígítási módszerrel és a korongdiffúziós módszerrel kapott eredmények összehasonlítása

Antibiotikumok	A leves-mikrohígítási módszerrel meghatározott MIC-értékek eredményei			A korongdiffúziós módszer eredményei		
	érzékeny	közepesen érzékeny	rezisztens	érzékeny	közepesen érzékeny	rezisztens
oxitetraciklin	25	0	0	25	0	0
enrofloxacin	24	1	0	25	0	0
amoxicillin	15	1	9	25	0	0
florfenikol	25	0	0	25	0	0
gentamicin	22	3	0	25	0	0
szulfametoxazol + trimetoprim	14	1	10	18	0	7
ceftiofur	23	1	1	25	0	0
tiamulin	4	14	7	11	14	0
tulatromicin	18	7	0	25	0	0
tilmikozin	13	10	2	25	0	0
penicillin	20	2	3	23	0	2

9 Megbeszélés/következtetések

A MIC-értékek alapján minden törzs érzékeny volt oxitetraciklinre és florfenikolra. A törzsek legalább 90%-a érzékeny volt enrofloxacinra és ceftiofurra. Jó, legalább 80%-os érzékenység volt jellemző továbbá gentamicinre és penicillinre. Tulatromicinre a törzsek 72%-a érzékeny volt. Amoxicillinre 60%-uk volt érzékeny, és valamivel több mint felük érzékeny volt szulfametoxazol+trimetoprimra és tilmikozinra. Tiamulinra csupán 4 törzs volt érzékeny a 25-ből (16%), 14 törzs mérsékelten érzékeny volt (56%), és 7 törzs volt rezisztens (28%). Amoxicillinnél, és szulfametoxazol+trimetoprim-nál nagy volt a rezisztens törzsek aránya (36 % és 40%), míg tilmikozinnál a közepesen érzékeny törzsből volt sok (40%). A 25 törzsből 3 törzs 3 antibiotikumra is rezisztens volt egyszerre, közülük az egyik amoxicillinre, ceftiofurra és tiamulinra, egy törzs szulfametoxazol+trimetoprim-ra, tiamulinra és penicillinre, és egy törzs pedig amoxicillinre, szulfametoxazol+trimetoprim -ra és tiamulinra volt rezisztens a MIC-értékei alapján. A 25-ből 6 törzs pedig 2 antibiotikumra volt rezisztens egyszerre a MIC értékei szerint, közülük 4 törzs szulfametoxazol+trimetoprim-ra és tiamulinra, 2 törzs pedig amoxicillinre és szulfametoxazol+trimetoprim -ra volt rezisztens.

A korongdiffúziós próbával jóval több törzs bizonyult érzékenynek. Közepesen érzékeny törzseket csupán tiamulin esetében, rezisztens törzseket pedig csak szulfametoxazol+trimetoprim, valamint penicillin esetén találtunk. A korongdiffúziós próba alapján nem volt olyan törzs amely több antibiotikumra is rezisztenciát mutatott volna.

Amoxicillinnél és tilmikozinnál volt a legnagyobb eltérés a két módszer között, a korongdiffúziós próbával itt mindegyik törzs érzékeny volt, miközben a MIC-értékeik alapján magas volt a rezisztens ill. közepesen érzékeny törzsek aránya. A tiamulin és a tulatromicin esetében is jelentős volt az eltérés a két módszer között. In vitro körülmények között tehát az oxitetraciklin, florfenikol, enrofloxacin és a ceftiofur bizonyultak leghatékonyabbnak a *P. multocida* ellen. A gentamicin és a penicillin is jó hatékonyságot mutattak.

A vizsgálatokhoz standard minőségű táptalajokat használtunk. Az eltéréseknek számos oka lehet, így a baktérium szuszpenziók töménysége, a szilárd táptalaj vastagsága, a táptalajokban lévő Ca^{2+} és Mg^{2+} -ionok koncentrációja, a használt antibiotikumok minősége. Azokban az esetekben, ahol feltűnően magas volt a rezisztens törzsek aránya, felmerült,

hogy magával az antibiotikummal lehet gond, esetleges bomlás miatt veszített a hatékonyságából. Így ezekben az esetekben újabb gyártási tételből származó antibiotikummal is megismételtük a vizsgálatot. Az eltérések oka lehet továbbá, hogy több antibiotikum esetében nem található határérték adat a standard MIC, és gátlási zóna értékekre a CLSI-könyvben[31]. A hiányzó adatokat egyéb forrásokból, cikkekből gyűjtöttem össze, viszont nem mindig sikerült *P. multocidára* megadott értékeket találni, ami befolyásolhatja az eredményeket.

A leveshígítási módszer pontosabb a korongdiffúziós módszernél, eltérések esetén ennek az eredményeit kell alapnak venni. A módszer összetettsége miatt könnyebb hibát ejteni benne, bár a felmerülő hibákat az eredmények ellenőrzése és validálása során ki tudtuk szűrni.

Azonban a jelen dolgozatban vizsgált kisebb mintaszám is befolyásolhatja az eredményeket, egyes kiugró értékek jobban torzíthatják az átlagot. Mindenképpen érdemes a jövőben is figyelemmel kísérni a rezisztencia alakulását, és folytatni a kutatást.

A mi vizsgálatunkban megállapított rezisztencia mértéke a világ más pontjain között cikkekhez hasonlítva átlagosnak mondható. Két Etiópiában készült tanulmányban a rezisztencia mértéke összességében magas volt, magasabb a mi eredményeinkhez képest[7, 19]. Egy franciaországi tanulmányban a rezisztencia mértéke alacsonyabb volt a mi vizsgálatunkhoz képest, azonban a florfenikolt kivéve mindegyik vizsgált antibiotikummal szemben előfordult kis arányban rezisztencia[4]. Egy spanyolországi és portugáliai tanulmányban szulfametoxazol+trimetoprim esetében alacsonyabb rezisztencia volt jellemző a mi eredményeinkhez képest, tetraciklinnel szemben magas arányú rezisztenciát mutattak ki, ezzel szemben a mi vizsgálatunkban pedig egyik törzsünk sem volt rezisztens oxitettraciklinre. A tanulmányban enrofloxacin rezisztenciát is kimutattak, amely a mi vizsgálatunkban nem fordult elő[5]. Egy következő spanyolországi tanulmányban pedig minden törzs rezisztens volt ampicillinre és klindamicinre, nagyon magas volt a rezisztencia aránya tylosintartarát-ra, szulfadimetoxin-ra, ezzel szemben számos antibiotikumra minden törzsük érzékeny volt. Összességében a rezisztencia mértéke magasabb volt a mi vizsgálatunkhoz képest[8]. Egy törökországi tanulmányban jóval alacsonyabb volt a rezisztencia mértéke a mi tanulmányunkhoz képest, 20 db vizsgált törzsből csupán egy törzs mutatott rezisztenciát, eritromicinnel és tilmikozinnal szemben[10]. Egy indiai

tanulmányban penicillinnel szemben nagy arányú volt a rezisztencia, a többi vizsgált antibiotikumra teljes érzékenység, illetve 10% alatti rezisztencia arány volt jellemző[6].

A rezisztens és közepesen érzékeny törzsek aránya az in vitro vizsgálatainkban egyes antibiotikumoknál jelentős volt, a juhok légzőszervi pasteurellosisában részt vevő *P. multocida* rezisztenciája nem elhanyagolható mértékű. Ebből arra lehet következtetni, hogy különösen fontos az adott állományból izolált *P. multocida* törzsek rezisztencia viszonyainak ismerete a kezelés sikeressége érdekében.

A szulfametoxazol+trimetoprim, az amoxicillin és a tiamulin esetében nagyobb fokú rezisztenciát tapasztaltunk, valamint tularomicinnál és a tilmikozinnál nagyobb arányú volt a mérsékelt érzékeny törzsek aránya. Ez alapján gondolhatunk arra, hogy ezeket az antibiotikumokat Magyarországon túlzott mértékben, vagy nem megfelelően használják, ezért alakulhatott ki az észlelt rezisztencia. A tularomicin és a tilmikozin makrolid antibiotikumok, a tüdőben fölhalmozódva nagyobb koncentrációt érnek el, ezáltal a *P. multocida* okozta légzőszervi fertőzések ellen akár még a mérsékelt érzékeny törzsekkel szemben is hatékonyak lehetnek. Az antibiotikum érzékenységi adatok alapján indokolt lehet ezeket helyettesítő szerek használata, mint: oxitetraciklin, penicillin, florfenikol, gentamicin, enrofloxacin, ceftiofur. A kezelésre használt szer kiválasztásához további szempontokat is figyelembe kell venni, mint az adott antibiotikum fontosságát a humán gyógyászat szempontjából, az antibiotikum farmakodinámiai és farmakokinetikai tulajdonságait, az alkalmazás módját, gyakoriságát, az élelmezés-egészségügyi várakozási időt, a kezelés költségeit. Az Európai Gyógyszerügynökség Antimikrobiális Tanácsadó Ad Hoc Szakértői Csoportja (AMEG) 4 kategóriába sorolta az antibiotikumokat, az A, B, C és D kategóriákba, melyek jelzik, hogy az adott antibiotikum használata az állatorvoslásban milyen mértékű kockázatot jelent a humán gyógyászat szempontjából. Az enrofloxacin és a ceftiofur a „B”-kategóriába tartoznak, használatuk a humán gyógyászat szempontjából nagy kockázatot jelent. A gentamicin és a florfenikol a „C”-kategóriába tartoznak, ezek használata kevesebb kockázatot jelent, mint a „B”-kategóriába tartozó antibiotikumok alkalmazása. Az oxitetraciklin és a penicillin pedig a „D” kategóriába tartoznak, ezek használata jelenti a legkevesebb kockázatot a humán gyógyászat számára.

Empirikus antibiotikum választás esetén érdemes figyelembe venni a hasonló kórképet előidézőni képes *Mannheimia haemolytica* antibiotikum érzékenységi eredményeit is.

10 Összefoglalás

Magyarországi juhok légzőszervi mintáiból izolált 25 db *P. multocida* baktériumtörzset vizsgáltunk, valamint meghatároztuk azok antibiotikum érzékenységét mind leves-mikrohígításos módszer, mind korongdiffúziós módszer segítségével. A két módszerrel kapott eredményeket összehasonlítottuk. Tüdő, hörgő, és orrtampon mintákból származtak a baktérium törzsek. 11 antibiotikumot használtunk a vizsgálatokhoz.

A MIC értékek szerint rezisztens törzseket 6 antibiotikumnál állapítottunk meg, a rezisztens törzsek aránya: szulfametoxazol+trimetoprim: 40% (10 törzs), amoxicillin: 36% (9 törzs), tiamulin: 28% (7 törzs), penicillin: 12% (3 törzs), tilmikozin: 8% (2 törzs) és ceftiofur: 4% (1 törzs) volt. Mérsékeltén érzékeny törzseket 9 antibiotikumnál találtunk, ezek: tiamulin: 56% (14 törzs), tilmikozin: 40% (10 törzs), tulatromicin: 28% (7 törzs), gentamicin: 12% (3 törzs), penicillin: 8% (2 törzs). Enrofloxacin, amoxicillin, szulfametoxazol+trimetoprim, és ceftiofur esetében mindegyiknél 1-1 törzs volt Mérsékeltén érzékeny (4%). 3 törzs 3 antibiotikumra is rezisztens volt egyszerre, egy törzs amoxicillin, ceftiofur, tiamulin, egy törzs szulfametoxazol+trimetoprim, tiamulin, penicillin, egy törzs pedig amoxicillin, szulfametoxazol+trimetoprim, és tiamulin esetében mutatott rezisztenciát. 6 törzs volt rezisztens összesen 2 antibiotikumra, ezek közül 4 törzs szulfametoxazol+trimetoprim és tiamulin, 2 törzs pedig amoxicillin és szulfametoxazol+trimetoprim antibiotikumokra volt rezisztens

A korongdiffúziós módszerrel rezisztens törzseket csupán szulfametoxazol+trimetoprim esetén (28%, 7 törzs) és penicillinnél (8%, 2 törzs) találtunk. Mérsékeltén érzékeny törzseket csak tiamulinnál találtunk (56%, 14 törzs). A korongdiffúziós módszer alapján nem volt olyan törzs, amelyik 1-nél több antibiotikumra rezisztens lett volna.

A két módszer közötti eltérések okát nem tudjuk, okok lehetnek például a táptalajok összetételének, a szilárd táptalaj vastagságának eltérései, az antibiotikumok minőségének hibái, a baktérium szuszpenziók töménységének eltérései. Az is lehet az ok, hogy nincs minden antibiotikumra standard MIC és gátlási zóna értékek megadva, azokat több esetben is más forrásokból kellett keresni, ahol nem volt mindig *P. multocidára* és kérődzőkre megadott érték.

11 Irodalomjegyzék/bibliográfia

1. Varga J, Rusvai M, Fodor L (2018) A háziállatok fertőző betegségei. Magyar Állatorvosi Kamara Kft., Budapest
2. Medveczky I, Rusvai M, Varga J, Tuboly S (1998) Állatorvosi járványtan I. Állatorvosi mikrobiológia Bakteriológia, virológia, immunológia, 2., változatlan kiadás. Mezőgazda Kiadó, Budapest
3. Cucco L, Massacci FR, Sebastiani C, Mangili P, Bano L, Cocchi M, Luppi A, Ortenzi R, Pezzotti G, Magistrali CF (2017) Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* strains isolated from hosts affected by various diseases in Italy. *Vet Ital* 53:21–27. <https://doi.org/10.12834/VetIt.661.3256.2>
4. Bourelly C, Cazeau G, Jouy E, Haennie M, Madec J-Y, Jarrige N, Leblond A, Gay E (2019) Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from diseased food-producing animals and pets. *Vet Microbiol* 235:280–284. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.07.017>
5. Bello JM, Chacon G, Pueyo R, Lechuga R, Marco L, Marco M, Alvarez C, Fraile L (2019) Antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from ovine respiratory clinical cases in Spain and Portugal. *Small Ruminant Res* 178:85–93. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.08.008>
6. Sahay S, Natesan K, Prajapati A, Kalleshmurthy T, Shome BR, Rahman H, Shome R (2020) Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from ovine respiratory infection: A study from Karnataka, Southern India. *Vet World* 13:1947–1954. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1947-1954>
7. Marru HD, Anijajo TT, Hassen AA (2013) A study on Ovine pneumonic pasteurellosis: Isolation and Identification of *Pasteurellae* and their antibiogram susceptibility pattern in Haramaya District, Eastern Hararghe, Ethiopia. *BMC Vet Res* 9:239. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-239>
8. Cid D, Francisco Fernandez-Garayzabal J, Pinto C, Dominguez L, Isabel Vela A (2019) Antimicrobial Susceptibility of *Pasteurella Multocida* Isolated from Sheep and Pigs in Spain - Short Communication. *Acta Vet Hung* 67:489–498. <https://doi.org/10.1556/004.2019.048>
9. Nielsen SS, Bicout DJ, Calistri P, Canali E, Drewe JA, Garin-Bastuji B, Rojas JLG, Schmidt CG, Herskin M, Michel V, Chueca MAM, Padalino B, Pasquali P, Roberts HC, Spoolder H, Stahl K, Velarde A, Viltrop A, Winckler C, Dewulf J, Guardabassi L, Hilbert F, Mader R, Baldinelli F, Alvarez J (2021) Assessment of animal diseases caused by bacteria resistant to antimicrobials: sheep and goats. *EFSA J* 19:e06956. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6956>

10. Guler L, Gunduz K, Sarisahin AS (2013) Capsular Typing and Antimicrobial Susceptibility of *Pasteurella multocida* Isolated from Different Hosts. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 19:843–849. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2013.8936>
11. Awosile BB, Heider LC, Saab ME, McClure JT (2018) Antimicrobial resistance in mastitis, respiratory and enteric bacteria isolated from ruminant animals from the Atlantic Provinces of Canada from 1994–2013. *Can Vet J-Rev Vet Can* 59:1099–1104
12. Torres-Blas I, Fernandez Aguilar X, Cabezon O, Aragon V, Migura-Garcia L (2021) Antimicrobial Resistance in Pasteurellaceae Isolates from Pyrenean Chamois (*Rupicapra pyrenaica*) and Domestic Sheep in an Alpine Ecosystem. *Animals* 11:1686. <https://doi.org/10.3390/ani11061686>
13. Gonzalez-Zorn B, Escudero JA (2012) Ecology of antimicrobial resistance: humans, animals, food and environment. *Int Microbiol* 15:101–109. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.163>
14. Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D (2013) *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby Elsevier, Edinburgh London New York Oxford Philadelphia St Louis Sydney Toronto
15. Sahay S, Shome R, Sankarasubramanian J, Vishnu US, Prajapati A, Natesan K, Shome BR, Rahman H, Rajendhran J (2018) Insights into the genome sequence of ovine *Pasteurella multocida* type A strain associated with pneumonic pasteurellosis. *Small Ruminant Res* 169:167–175. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.10.004>
16. Zhang W, Liu X, Liu M, Ma B, Xu L, Wang J (2017) Development of a Multiplex Pcr for Simultaneous Detection of *Pasteurella Multocida*, *Mannheimia Haemolytica* and *Trueperella Pyogenes*. *Acta Vet Hung* 65:327–339. <https://doi.org/10.1556/004.2017.032>
17. Jones C, Chowdhury S (2010) Bovine Herpesvirus Type 1 (BHV-1) is an Important Cofactor in the Bovine Respiratory Disease Complex. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 26:303–321. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.04.007>
18. Gálfi P, Csikó Gy, Jerzsele Á (2015) *Állatorvosi gyógyszerteran III., Második, javított kiadás*. Robbie-Vet Kft., Budapest
19. Abate FM, Fentie Kassa T (2023) Isolation and identification of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* from symptomatic and asymptomatic sheep and their antibiotic susceptibility patterns in three selected districts of north Gondar zone, Gondar Ethiopia. *Veterinary Medicine and Science* 9:1803–1811. <https://doi.org/10.1002/vms3.1166>
20. Johnson CM, Grossman AD (2015) Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. *Annu Rev Genet* 49:577–601. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-055018>
21. Alderliesten JB, Duxbury SJN, Zwart MP, de Visser JAGM, Stegeman A, Fischer EAJ (2020) Effect of donor-recipient relatedness on the plasmid conjugation frequency: a

- meta-analysis. *BMC Microbiology* 20:135. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01825-4>
22. Olsen AS, Warrass R, Douthwaite S (2015) Macrolide resistance conferred by rRNA mutations in field isolates of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70:420–423. <https://doi.org/10.1093/jac/dku385>
 23. San Millan A, Escudero JA, Gutierrez B, Hidalgo L, Garcia N, Llagostera M, Dominguez L, Gonzalez-Zorn B (2009) Multiresistance in *Pasteurella multocida* Is Mediated by Coexistence of Small Plasmids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53:3399–3404. <https://doi.org/10.1128/AAC.01522-08>
 24. Kehrenberg C, Salmon SA, Watts JL, Schwarz S (2001) Tetracycline resistance genes in isolates of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia varigena* from bovine and swine respiratory disease: intergeneric spread of the tet(H) plasmid pMHT1. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48:631–640. <https://doi.org/10.1093/jac/48.5.631>
 25. San Millan A, Garcia-Cobos S, Antonio Escudero J, Hidalgo L, Gutierrez B, Carrilero L, Campos J, Gonzalez-Zorn B (2010) *Haemophilus influenzae* Clinical Isolates with Plasmid pB1000 Bearing bla(ROB-1): Fitness Cost and Interspecies Dissemination. *Antimicrob Agents Chemother* 54:1506–1511. <https://doi.org/10.1128/AAC.01489-09>
 26. Michael GB, Kadlec K, Sweeney MT, Brzuszkiewicz E, Liesegang H, Daniel R, Murray RW, Watts JL, Schwarz S (2012) ICEPmu1, an integrative conjugative element (ICE) of *Pasteurella multocida*: analysis of the regions that comprise 12 antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67:84–90. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr406>
 27. Michael GB, Kadlec K, Sweeney MT, Brzuszkiewicz E, Liesegang H, Daniel R, Murray RW, Watts JL, Schwarz S (2012) ICEPmu1, an integrative conjugative element (ICE) of *Pasteurella multocida*: structure and transfer. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67:91–100. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr411>
 28. Babetsa M, Sandalakis V, Vougidou C, Zdragas A, Sivropoulou A, Psaroulaki A, Ekateriniadou LV (2012) Tetracycline resistance genes in *Pasteurella multocida* isolates from bovine, ovine, caprine and swine pneumonic lungs originated from different Greek prefectures. *Afr J Microbiol Res* 6:3917–3923. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.208>
 29. Flanagan JN, Steck TR (2017) The Relationship Between Agar Thickness and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Indian Journal of Microbiology* 57:503. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0683-z>
 30. Sweeney MT, Diaz-Campos DV, Bowden R, Fritsche TR, Hayes J, Langston C, Lubbers BV, Martin-Jimenez T, Miller C, Pallotta C, Papich MG, Parkinson A, Schwarz S, Traczewski MM (2018) CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals., 5th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA

31. Lubbers BV, Papich MG, Schwarz S, Bowden R, Diaz-Campos DV, Fielder M, Langston C, Li XZ, Martinez MN, Miller C, Morrissey I, Pallotta C, Shryock TR, Simjee S, Sinnott-Stutzman V, Sweeney MT, Traczewski MM, Trott D, Yan SS (2018) CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals., 4th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
32. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, 2023. <http://www.eucast.org>.
33. Sarangi LN, Thomas P, Gupta SK, Priyadarshini A, Kumar S, Nagaleekar VK, Kumar A, Singh VP (2015) Virulence gene profiling and antibiotic resistance pattern of Indian isolates of *Pasteurella multocida* of small ruminant origin. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 38:33–39. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.11.003>
34. Weinstein MP, Lewis JS, Bobenchik AM, Campeau S, Cullen SK, Galas MF, Golg H, Humphries RM, Kirn TJ, Limbago B, Mathers AJ, Mazzulli T, Richter SS, Satlin M, Schuetz AN, Simner PJ (2021) CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing., 31st ed. Clinical and Laboratory Standards Institute
35. Jones RN, Pfaller MA, Rhomberg PR, Walter DH (2002) Tiamulin Activity against Fastidious and Nonfastidious Veterinary and Human Bacterial Isolates: Initial Development of In Vitro Susceptibility Test Methods. *J Clin Microbiol* 40:461–465. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.2.461-465.2002>
36. de Jong A, Thomas V, Simjee S, Moyaert H, El Garch F, Maher K, Morrissey I, Butty P, Klein U, Marion H, Rigaut D, Vallé M (2014) Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: The VetPath study. *Veterinary Microbiology* 172:202–215. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.04.008>

12 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a témavezetőmnek, Dr. Tóth Gergelynek a segítséget, mind a laboratóriumi munka, mind a dolgozat megírása során, amely nélkül nem jöhetett volna létre ez a munka. Köszönettel tartozom a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszéknek, hogy helyet, eszközöket biztosított a munkához, valamint a tanszék munkatársainak: Dr. Fodor Lászlónak, Dr. Makrai Lászlónak, Dr. Tenk Miklósnak, Góbi Jessicának, Jutasi Alexandrának és Tóth Rékának. Szeretnék köszönetet mondani az ÁDI budapesti intézetének bakteriológiai osztályán dolgozó Dr. Jánosi Szilárdnak, Szombati Kittinek, Szombatiné Boda Ildikónak és Süle Zsuzsannának. A laborban sokszor egymás mellett dolgoztam Kovács Fruzsínával, neki is szeretném megköszönni hogy meg tudtuk beszélni a tapasztalatainkat, segítettük egymás munkáját.



Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: KÖRÖMI ISTVÁN LAJOS
 Neptun-kódja: 124SKY
 A témavezető neve és beosztása: DR. TÓTH GERGELY, EGYETEMI TANÁRSÉGÉD
 Tanszék: JÁRVÁNYTANI ÉS MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK
 A diplomadolgozat címe: JUHOKBÓL ISOLÁLT PASTEURELLA MULTOCIDA TÖRZSEK ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLATA

Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023	02	16		<i>[Signature]</i>
2.	2023	03	03		<i>[Signature]</i>
3.	2023	03	09		<i>[Signature]</i>
4.	2023	03	24		<i>[Signature]</i>
5.	2023	03	31		<i>[Signature]</i>

Érdemjegy az első félév végén: 5

Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023	07	21		<i>[Signature]</i>
2.	2023	08	10		<i>[Signature]</i>
3.	2023	09	11		<i>[Signature]</i>
4.	2023	09	18		<i>[Signature]</i>
5.	2023	10	31		<i>[Signature]</i>

Érdemjegy a második félév végén: 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, védésre alkalmasnak találtam.

Hallgató aláírása: *Némethi István György*

[Handwritten signature]
.....
témavezető aláírása

Tanszéki előadó aláírása: *Juhász K. Mária* Átvétel dátuma: *2023. 10. 31*