

TDK DOLGOZAT

Yurt Attila

2022

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék



Magyarországi eredetű propolisz és nitroimidazol hatóanyagok *in vitro* hatékonysága *Tritrichomonas foetus* esetén

Készítette:

Yurt Attila

V. évf. ao. hallgató

Témavezető:

Dr. Kerek Ádám

ÁTE, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, PhD-hallgató

Budapest

2022

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
1. Bevezetés.....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1. A propoliszról általában.....	5
2.2. A propolisz parazitaellenes hatása.....	5
2.3. A fontosabb <i>Trichomonas</i> fajok jelentősége.....	8
2.4. A <i>Tritrichomonas foetus</i> fertőzés kezelése.....	10
2.5. Alternatív kezelési lehetőségek.....	13
3. Célkitűzések.....	14
4. Anyag és módszer.....	15
4.1. A vizsgált paraziták és a propolisz eredete.....	15
4.2. A paraziták fenntartása, szaporítása.....	15
4.3. A paraziták mennyiségi meghatározása.....	15
4.4. A propolisz kivonattal történő vizsgálat.....	16
4.5. A nitroimidazol hatóanyagokkal történő vizsgálat.....	19
5. Eredmények.....	20
5.1. Életképesség és szaporodás.....	20
5.1.1. Macska eredetű izolátum.....	20
5.1.2. Szarvasmarha eredetű izolátum.....	20
5.2. A propoliszos kezelés eredményei.....	21
5.2.1. Macska eredetű izolátum.....	21
5.2.2. Szarvasmarha eredetű izolátum.....	23
5.3. A nitroimidazolokkal történő kezelés eredményei.....	24
5.3.1. A DMSO-t tartalmazó oldószer hatása.....	24
5.3.2. Ronidazol hatékonysága macska eredetű izolátum esetén.....	25
5.3.3. Ronidazol hatékonysága szarvasmarha eredetű izolátum esetén.....	26
5.3.4. Egyéb nitroimidazolok hatékonysága szarvasmarha eredetű izolátum esetén.....	26
6. Következtetések.....	29
7. Összefoglalás.....	31
8. Summary.....	32
9. Irodalomjegyzék.....	33
10. Köszönetnyilvánítás.....	41

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

DMSO	Dimetil-szulfoxid
DNS	Dezoxiribonukleinsav
IL	Interleukin
MIC	Minimális gátló koncentráció (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
PCR	Polimeráz-lánreakció (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
<i>T. foetus</i>	<i>Tritrichomonas foetus</i>
<i>T. vaginalis</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
TNF α	Tumor nekrozis faktor-alfa

1. BEVEZETÉS

A *Tritrichomonas foetus* (*T. foetus*) egy világszerte előforduló egysejtű parazita, amely házimacskákban a vastagbél eredetű hasmenés egyik leggyakoribb kórokozója. A mindennapi praxisban gyakran használt antimikrobiális szerek legtöbbször rezisztens. Jelenleg a ronidazol az egyetlen olyan hatóanyag, ami teljes mértékben képes eliminálni a protozoát, azonban ez nem engedélyezett macskák számára, alkalmazása során egyes esetekben kialakulhatnak idegrendszeri tünetek, illetve ez ellen is egyre gyakoribb az antimikrobiális rezisztencia. Ugyanezen *Tritrichomonas* faj egy különálló, genetikailag eltérő változata szarvasmarhákban okoz hüvely- és méhnyakgyulladást, illetve vetélést a vemhesség első felében. Utóbbi mérhetetlen gazdasági károkat okoz azokban az országokban, ahol még mindig elterjedt a természetes úton való termékenyítés, legfőképpen igaz ez az Amerikai Egyesült Államokra. Mivel élelmiszertermelő állatok esetén tilos a nitroimidazolok alkalmazása, így ebben a fajban a betegség gyakorlatilag gyógyíthatatlan, a protokoll vagy tenyésztésből való kizárás, vagy kényszervágás. A fentiek alapján kétségtelen, hogy szükség van alternatív kezelési módokra.

A propolisz egy olyan gyantaszzerű, természetes körülmények között is előforduló vegyület, amelyet méhek termelnek. Már számos kutatás bizonyította antibakteriális, antimikotikus és antiparazitikus hatását. Összetételét nagy mértékben befolyásolja a méhek genetikája, és az adott terület flórája.

Jelen tanulmány célja, hogy meghatározzuk a magyarországi eredetű propolisz etanolos kivonatának *in vitro* hatékonyságát macskából és szarvasmarhából izolált *T. foetus* ellen, valamint összehasonlítsuk a nitroimidazolok hatékonyságával.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A propolisról általában

A propolis összetétele hozzávetőleg 50% gyanta, 30% viasz, 10% illóolaj, 5% pollen és 5% egyéb szerves összetevő [1–5], pontos összetétele azonban nagyban függ a földrajzi területtől [6], a terület flórájától [1, 2, 7], az éghajlati viszonyoktól [8], az évszaktól [1, 2], a méhek genetikájától [2, 3] és az oldószer minőségétől, amivel kivonják belőle az aktív komponenseket [9]. A propolis olyan természetes anyag, melyet a méhek növényi eredetű gyantából, pollenből, valamint rügyek nedvéből [1, 7, 10] nyálenzimek segítségével hidrolízis útján állítanak elő, majd azt méhviasszal keverik össze [2]. A propolis legfontosabb, flavonoid típusú összetevői a fenolsavak és észterek [8], melyekben a flavonoid molekula B-gyűrűje felel többek között a baktériumok nukleinsav-szintézisének gátlása révén a baktériumellenes hatékonyságért [1].

A propoliszt a méhek felhasználják a kórokozók elleni védekezésben, például mumifikálva a betolakodókat, ezzel megakadályozva a tetem lebomlását. Ezen kívül a kaptár falának sérüléseit propolisszal töltik ki, ősszel és télen pedig szűkítik vele a kaptár bejáratát [11–14].

2.2. A propolisz parazitaellenes hatása

A propolisz protozoaellenes hatásának alapja számos hatásmechanizmus lehet, például megzavarja a foszfolipid anyagcserét, így csökkentve a paraziták számára esszenciális foszfatidil-glicerol és foszfatidil-inozitol szintjét, melynek következtében sejtlízis indul meg [15]. Összetevői közül a rozmarinsav és az apigenin komponensek szintén sejtlízist indukálnak, valamint a citoplazma kondenzációját okozzák, a sejtmag és a sejtmag dezoxiribonukleinsavjának (DNS) aggregációja következik be [16]. A rezveratrol befolyásolja a hidrogenoszómák metabolizmusát, a hősokkfehérje-70 inaktiválása révén [17–19]. A kámferol befolyásolja az aktin és miozin II nehézlánc expressziót, ami gátolja a paraziták megtapadását [20]. Az apigenin blokkolja a sejtproliferációt, fokozva a reaktív oxigénvegyületek (ROS) képződését, ezáltal mitokondriális duzzadást okozva [21]. A kvercetin vaskelátként a ribonukleotid-reduktáz gátlása révén csökkenti a DNS szintézisét [22]. A koffeinsav pedig morfológiai változásokat eredményez a mitokondriális membránon, ami apoptózishoz vezet, fokozódik a ROS termelődés, a tumor nekrotikus faktor-alfa (TNF α) expressziója, ezáltal a makrofágok aktivitása, így gyulladós folyamatok indulnak el [23]. A lupán összetevő a citoszol vakuolizáltságához vezet, ezen kívül erős affinitással kötődik a DNS tropoizomerázhoz [24, 25]. A maszlinsav gátolja a

felszíni fehérjekomplex proteáz működését, ami nélkülözhetetlen a gazdasejtbe jutáshoz [26, 27].

Leishmaniózis esetén leírták, hogy a propolisz megakadályozza a promasztigóták proliferációját, ezáltal eredményezve gyulladáscsökkentő hatást. Serkenti a makrofágok aktivitását, Toll-like receptor 2 (TLR-2), TNF- α , interleukin-4 (IL-4) és IL-17 termelődését és az IL-17 downregulációját. A *Plasmodium* és *Trypanosoma* fajok okozta fertőzés kezelésében erős immunmoduláló hatása van a propolisznak, mivel megemeli az egyes citokinek koncentrációját a vérben (interferon- γ , TNF- α , és a granulocita-makrofág kolonizációs stimuláló faktor). A *Trypanosoma cruzi* esetén a proliferáció gátlását figyelték meg, amit a propolisz flavonoid és aromás savtartalmának tulajdonítanak. Továbbá a *Blastocystis* egysejtű paraziták növekedését is gátolja, valószínűsíthetően a metronidazolhoz hasonló apoptotikus hatásmechanizmusok révén [28].

Brazil propolisz kivonatot vizsgálva *Leishmania infantum* esetén 37,45-200,66 $\mu\text{g/ml}$ közötti minimális gátló koncentráció (MIC) értékeket állapítottak meg, *Leishmania braziliensis* esetén 35,22-55,79 $\mu\text{g/ml}$ közötti MIC értékeket írtak le [7]. Egy másik vizsgálatban előbbi protozoa esetében húszféle kubai propolisz kivonatot vizsgálva 2-22,2 $\mu\text{g/ml}$ közötti MIC értékek mellett igen magas citotoxikus hatást is megfigyeltek [29]. Utóbbi protozoa esetében 38 $\mu\text{g/ml}$ hatékonyságot találtak [30], 70%-os etanos kivonat esetén 48,6 $\mu\text{g/ml}$ MIC értéket írtak le, ugyanebben a tanulmányban bolgár eredetű propolisz esetén 142,2 $\mu\text{g/ml}$ MIC értéket figyeltek meg [31], bolíviai propolisz kivonatot vizsgálva a fenolban gazdag minták esetén 7,8-59,9 $\mu\text{g/ml}$, a triterpénekben gazdag minták esetén 14,8-84,6 $\mu\text{g/ml}$ közötti MIC értékeket írtak le [32]. *Leishmania mexicana* esetén brit propolisz kivonatának vizsgálata során 0,28-5,67 $\mu\text{g/ml}$ közötti, három bolgár propolisz kivonatnál 0,29-1,17 $\mu\text{g/ml}$ közötti, kettő litván propolisz kivonatnál 0,65-1,55 $\mu\text{g/ml}$ tartományban lévő MIC értékeket írtak le [33]. *Leishmania chagazi* esetén bolgár propolisz kivonatot vizsgálva 53,9 $\mu\text{g/ml}$, brazil propolisz esetén pedig 49,9 $\mu\text{g/ml}$ MIC értéket határoztak meg [31].

Hasonlóan számos tanulmány áll rendelkezésre *Trypanosoma cruzi* esetén, ahol brazil propolisz kivonatot vizsgálva 31-59,84 $\mu\text{g/ml}$ közötti MIC értékeket írtak le [7], egy másik vizsgálat során tízféle propolisz hatékonyságát vizsgálva 421-1437 $\mu\text{g/ml}$ közötti MIC értéket találtak [34], azonban húszféle kubai propoliszt vizsgálva 1,6-9 $\mu\text{g/ml}$ közötti MIC értékeket is leírtak [29]. Portugáliából származó propolisz kivonatok MIC értékei 6,2 $\mu\text{g/ml}$

és 7,7 µg/ml voltak [35]. *Trypanosoma brucei* kilencféle nigériai propoliszos vizsgálata során 3,9-74,7 µg/ml közötti MIC értékeket állapítottak meg [36], egy átfogó, harmincféle brit propolisz kivonatát vizsgáló tanulmányban 2,9-22,1 µg/ml közötti MIC értékeket detektáltak [33], egy másik brit vizsgálatban 3-14,04 µg/ml közötti MIC értékeket találtak [37], háromféle bolgár propolisz esetén 3,6-6,28 µg/ml, kétféle litván propolisz esetén 16,1-25 µg/ml közötti MIC értékeket [33], szaúdi propolisz esetén 4,6 µg/ml MIC értéket találtak [38]. Portugália két régiójából származó propolisz kivonatát vizsgálva 1,7 µg/ml és 3,8 µg/ml MIC értékeket írtak le [35]. *Trypanosoma congolense* esetén harmincféle brit propolisz kivonatának vizsgálata során 2,13-35,7 µg/ml közötti, bolgár propolisznál 1,96-3,69 µg/ml közötti, litván propolisznál 23,4-30,9 µg/ml közötti MIC értékeket találtak [33].

A maláriát okozó *Plasmodium falciparum* esetén is számos tanulmány készült, négy iráni eredetű propolisz kivonatát vizsgálva 27,1-80 µg/ml közötti [39], kubai propoliszt vizsgálva 0,2-12,5 µg/ml közötti [29], líbiai propolisz esetén 12,4-49,2 µg/ml közötti [15], egy másik tanulmányban 2,3-63,8 µg/ml közötti MIC értékeket írtak le [40]. Portugáliai eredetű propolisz kivonatokot vizsgálva 8,8 µg/ml és 30,1 µg/ml MIC értékeket állapítottak meg [35].

Trichomonas nemzetség esetén elsősorban humán vizsgálati adatok állnak rendelkezésre. *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*) protozoával szemben a propolisz etanolos kivonatát vizsgálva az 500 µg/ml koncentráció 24 óra alatt teljes mértékben képes volt a trophozoita alakokat elpusztítani [41]. Egy másik tanulmány során 18 féle kubai propolisz *T. vaginalis* ellenes hatását vizsgálták. Ezeket a mintákat 3 fő csoportra lehetett osztani az alapján, hogy mi volt a legfőbb kémiai összetevőjük (polyizoprenilált benzofenonok, izoflavonoidok, illetve triterpenoidok). Parazitaellenes aktivitás 5 minta esetében volt számottevő 3,2 és 9,1 µg/ml közötti MIC értékeket mutatva. Érdekesség, hogy az antiparazitikus hatékonyság és a propolisz kivonatok legfőbb kémiai komponense között nem volt semmiféle korreláció, amiből arra következtethetünk, hogy a kisebb százalékban előforduló összetevők egymásra gyakorolt hatásának van a legszámottevőbb szerepe a kórokozók elleni hatékonyságban, legyen az szinergizmus miatti erősebb-, vagy antagonizmus miatti gyengébb parazitaellenes hatás [42]. *Trichomonas gallinae* protozoával szemben egy 2016-os vizsgálat során egyiptomi propolisz vizes oldatánál azt találták, hogy 50 000 µg/ml koncentrációban 48 óra után, 75 000 µg/ml koncentrációban már 24 óra után teljes mértékben képes volt a protozoákat elpusztítani [43]. Hazai vizsgálatok során

propolisz etanolos kivonata *Trichomonas gallinae* esetén 1100-5000 µg/ml közötti koncentrációban mutatott parazitaellenes hatékonyságot [44].

2.3. A fontosabb *Trichomonas* fajok jelentősége

A *T. vaginalis* a humán trichomoniázis kórokozója, amely a világ legelterjedtebb nem virális eredetű, venereális úton terjedő betegsége emberben. Nőkben sok különböző tünetet okoz a betegség, a két leggyakoribb a *vaginitis* és a *cervicitis*, [45] míg férfiakban a betegség az esetek többségében tünetmentes, ez a tulajdonsága hasonlóságot mutat a *T. foetus* szarvasmarhát fertőző genotípusával [46]. Relatívén enyhe tünetei miatt a betegség egy ideig alulkutatott volt, azonban az egyre növekedő esetszámok miatt (főleg az Amerikai Egyesült Államokban), valamint mivel bebizonyították, hogy más szexuális úton terjedő kórokozókkal együtt fertőzve jelentősen megnőhet a morbiditás, a *T. vaginalis* jelentősége megkérdőjelezhetetlenné vált [47].

A *Trichomonas gallinae* számos madárfaj, köztük elsősorban a házi galamb (*Columba livia domestica*) trichomoniázisát okozó protozoa. A sárgás, plakkos lerakódások tipikusan a felső légutakban, és az emésztőcsatorna felső szakaszában jelentkeznek, kifejezetten a garatüregben és a begyben okozva klinikai tüneteket. Súlyos esetben a fertőzés a nyelőcsövet is érintheti, a bélfalon átjutva megfertőzheti az ereket, és a májat is. A fiatal állatoknál igen magas a mortalitás, azonban a kifejlett madarak általában tünetmentesek, vagy csak a teljesítményük romlik. Terjedése a madarak ivóvizén, eleségén keresztül jellemző, azonban a fiókák begytejjel és köldökcsonton keresztül is fertőződhetnek [43, 48].

A *Trichomonas suis* egy világszerte előforduló protozoa, amely gyakran megtalálható sertések orrüregében, gyomrában, vak-, illetve vastagbelében. Klinikai tünetek az esetek többségében nem fordulnak elő. Izoenzim analízis, immunológiai tanulmányok, gazdaállat specificitási vizsgálatok és molekuláris biológiai kutatások alapján ez a faj teljes mértékben megegyezik a *T. foetus* szarvasmarhát fertőző genotípusával, azonban a bizonyítékok ellenére a nomenklaturát még nem frissítették [49–52].

A *T. foetus* egy három elülső ostorral rendelkező *mucosoflagellata*. Ennél a fajnál különbséget kell tenni gazdaállat alapján két genotípus között [53]. A szarvasmarhát megbetegítő *T. foetus* és a macskát megbetegítő *T. foetus* teljes genomja között nincsenek számottevő különbségek, a leglényegesebb eltérés az *internal transcribed spacer-2 (ITS-2)* régióban található egypontos nukleotid polimorfizmus (*single nucleotide polymorphism*,

[SNP]), valamint polimorfizmus az elongációs faktor-1-alfa és cisztein proteáz 8 szekvenciák között található [53–56].

A *T. foetus* macskát fertőző genotípusát régen azonosnak gondolták a szarvasmarhából származó izolátumokkal, de mára már kiderült, hogy genetikailag eltérőek [55–57]. A fertőzés leggyakrabban tenyészetekben [58, 59], menhelyeken [60] és kiállításokon [61, 62] fordul elő. A klinikai tünetek többsége gyomor-bélrendszeri, melyek közül a leggyakoribb a hasmenés (az esetek kb. 98%-a), csökkent étvágy, anorexia, testsúlycsökkenés (20%), hasi fájdalmak, bágyadtság (10%) [63, 64]. A *T. foetus* macskákban krónikus vastagbél eredetű hasmenést okoz, amelyet rendkívül nehéz kezelni, hiszen az engedélyezett hatóanyagok közül a metronidazol nem elég hatékony, így a kezelés során az állatorvos sokszor kénytelen ronidazolt használni, ezzel azonban több probléma is van: egyrészt az Európai Unióban nem engedélyezett macskákban, használata így *off label*, másrészt a ronidazol rezisztencia terjedése is egyre számottevőbb [65, 66]. A betegség terjedése elsősorban szájon át történik fertőzött macska bélsarának elfogyasztásával [67]. A klinikai tünetek a diagnózis felállítását követően 5-24 hónapig perzisztálhatnak, de ezek eltűnését követően is kimutatható a parazita a bélsárból *PCR*-el a macskák felében [65]. A betegség mortalitása igen alacsony, de fiatal állatok esetén előfordulhat a fertőzés halálos kimenetele [68, 69]. Fajtatiszta macskákban gyakrabban diagnosztizálják (leggyakrabban abesszin, bengáli és sziámi fajtákban), azonban ennek oka valószínűleg az, hogy ezek az egyedek a tenyészetekben zsúfoltan élnek, ami elősegíti a parazita terjedését, mintsem, hogy valódi genetikai predispozícióról lenne szó [70, 71]. A betegség prognózisa alapvetően jó. A macskák többségében nem figyelhető meg kondíció romlás a fertőzést követően, illetve az esetek 88%-ában 2 év után a bélsár normális konzisztenciája visszatér [65].

A *T. foetus* szarvasmarhát fertőző genotípusa egy venereális úton terjedő betegséget okoz, amely az összes olyan országban előfordul, ahol elsősorban még természetes úton termékenyítenek [72]. A legnagyobb gazdasági kárt az Amerikai Egyesült Államokban okozza. Wyoming az egyetlen olyan állam, ahol 20 év szigorú szabályozása következtében (pl. tilos a fertőzött bikák importja, kötelező levágni a bizonyítottan fertőzött állatokat) sikerült teljesen eradikálni a kórokozót [73]. A fertőzés bikákban tünetmentes (ezáltal nehezen detektálható), azonban ezek a példányok a parazita fő rezervoárjai, hiszen természetes körülmények között az egyetlen módja a kórokozó átadásának a párzás [46]. A megfertőződést követően az idősebb bikák krónikus hordozóvá válnak, ez valószínűsíthetően a pénisz és a *praeputium epithelialis* kriptáinak a mélyülésével köthető

össze a 3-4 évnél idősebb egyedekben. A mélyebb kripták mikroaerofil környezetet biztosítanak, amely ideális a krónikus fertőződés kialakulásához [74]. Az ennél fiatalabb állatok csak rövid időre képesek megfertőződni, ezért csak átmeneti hordozók [75]. A gazdasági károk legfőbb oka a tehenekben jelentkező klinikai tünetek: *vaginitis*, vetélés [76], újravemhesülési zavarok, *pyometra* [72]. A vetélés leggyakrabban a vemhesség első 5 hónapjában következik be, amelyet egy 2-6 hónapos infertilitási periódus követ, ezalatt az időszak alatt az immunrendszer megtisztítja a nemi utakat a parazitától [77]. *T. foetus* ellen létezik vakcina szarvasmarhák esetén, azonban ez nem gátolja meg a megbetegedést, csupán a vetélés kockázatát, illetve a fertőzöttség időtartamát csökkenti [78].

Kísérleti fertőzések alapján lehetséges, hogy a két különböző *T. foetus* genotípus fertőzze a másik gazdaállatot, azonban nem akkora hatékonysággal, mint a gazdaállatra specifikus parazita. Macskából származó *T. foetus* törzsek üszökbe való beoltását követően ugyanúgy kialakult a *vaginitis*, *cervicitis* és az *endometritis*, azonban az *endometriális epithelium* károsodása jóval enyhébb volt, mint szarvasmarhák saját trichomoniázisa esetén [79]. A szarvasmarhából származó törzsek is képesek voltak megfertőzni a macskákat, azonban jóval kisebb volt rá az állatok fogékonysága (a macskák 40%-a lett pozitív) és a tünetek is enyhébbek voltak [80].

A betegség prevalenciája magas, azonban nagyon gyakran aluldiagnosztizált. Ennek egyik oka az, hogy sok esetben egyidejű fertőzöttség van jelen *Giardia duodenalis*-szal, amely egy másik vastagbél eredetű hasmenést okozó parazita, diagnosztikája jóval egyszerűbb [67, 81]. A *T. foetus* definitív diagnózisa polimeráz-lánreakció (PCR) vizsgálattal lehetséges, amit általában külső labor végez [65, 67]. Egy több, mint 1700 macskát érintő tanulmány során kiderült, hogy a lehető legpontosabb PCR vizsgálati eredmény érdekében bélsármintavevő pálcát érdemes alkalmazni [82].

A *T. foetus* zoonotikus veszélye elenyésző, csak egyetlen dokumentált humán esetről tudunk, egy immunszupresszált beteg esetén, ahol meningoencephalitist okozott a parazita [83].

2.4. A *Tritrichomonas foetus* fertőzés kezelése

A különféle trichomoniázisok kezelésére világszerte az 5-nitroimidazolok csoportja az egyik leggyakrabban alkalmazott gyógyszercsoport, a humán- és az állatgyógyászatban egyaránt [84–88]. A parazita sejtmembránján passzív transzporttal átjutva nitro csoportjuk nitrogén-eredetű szabadgyökké redukálódik ferredoxin és flavodoxin által, így

genotoxikus metabolitok (mutagének) keletkeznek, például acetamid, illetve N-(2-hidroxietyl) oxámsav. Ezen anyagok genotoxicitása abban rejlik, hogy képesek reakcióba lépni a DNS guanozinjával [89–91].

Mivel jelenleg tilos a nitroimidazolok alkalmazása élelmiszer-termelő állatfajok esetén (az Európai Unióban és az Amerikai Egyesült Államokban egyaránt), ezért a szarvasmarhák *T. foetus* fertőzésére gyakorlatilag nem létezik engedélyezett, kellően hatékony kezelési módszer [92]. Azokban az országokban, amelyekben még nem tiltott a gyógyszercsoport, az ipronidazol kiváló hatékonysággal alkalmazható intramuszkulárisan, 2-3 napos szisztémás penicillin kúrát követően. Erre azért van szükség, mert az állat természetes *praeputiális* baktérium flórája inaktíválhatná az önmagában alkalmazott ipronidazolt [93].

A macskák *T. foetus* fertőzése ellen a leghatékonyabb jelenleg ismert szer a ronidazol, napi egyszeri 30 mg/kg dózisban 2 héten át, azonban az ilyen magas dózis és a hosszú kezelés ellenére is csupán a kezelt macskák 65%-a mutat javulást [63, 64, 94], illetve egyes példányokban neurotoxikus tüneteket idézhet elő. A hatóanyag magas *per os* biológiai hasznosulása és a lassú eliminációja (kb. 10 órás felezési idő) a szervezetből hozzájárul ahhoz, hogy a ronidazol napi kétszeri alkalmazása hajlamosíthat a neurotoxikus tünetek kialakulására [95]. *Per os* alkalmazva, ha a tablettán guargumi bevonatot alkalmazunk, akkor az idegrendszeri tünetek kialakulásának esélye lecsökken, amellet, hogy a biológiai hasznosulás nem romlik [96]. A ronidazol jelenleg nem engedélyezett macskákra, tehát használata *off label*, azaz a felelősség az állatorvosé [97]. A ronidazol hozzávetőlegesen tízszer hatékonyabb *T. foetus* kezelésében, mint a metronidazol [94].

A metronidazol engedélyezett hatóanyag macskák számára, és bár számos anaerob, illetve mikroaerofil mikroorganizmus (többek között a *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori*) okozta fertőzés ellen hatásosnak bizonyult [89], a *T. foetus* eliminációjára nem képes, csupán a kezelés időtartama alatt javul a bélsár konzisztenciája, ahogy a hatóanyag adagolása megszűnik a hasmenés visszatér, általában még súlyosabb formában, mint a metronidazol kúra előtt [65, 94, 98, 99]. Az 5-nitroimidazolok közül a metronidazol a legelterjedtebb az állatgyógyászatban, ugyanakkor ennek a legrövidebb a felezési ideje (6-10 óra) [100, 101].

A tinidazol egy második generációs 5-nitroimidazol, melynek hatékonysága szinte megegyezik a metronidazoléval. *T. vaginalis*, *Giardia duodenalis*, és *Entamoeba histolytica*

ellen engedélyezett a humán gyógyászatban a metronidazol rezisztens törzsek esetén [102, 103]. Relatív hosszú felezési ideje (12,5 óra emberben, 8,4 óra macskában) kiválóan alkalmazhatóvá teszi a klinikumban, azonban kutyában történő alkalmazása nem praktikus, mert ebben a fajban csupán 4,4 óra a felezési ideje [104]. A *T. foetus* ellen ez a hatóanyag sem bizonyult kellően hatékonynak, csupán a kezelés időtartama alatt észlelhető javulás, a parazitát teljes mértékben eradikálni képtelen. Ennek oka valószínűleg az, hogy a tinidazol nem képes elérni a megfelelő koncentrációt a vastagbélben, hiszen *in vitro* kísérletek során, már ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációk esetén is gátolta a parazita szaporodását [105].

A szeknidazol hatékonysága, biztonságossága, és kiváló farmakokinetikai tulajdonságai (felezési ideje körülbelül 17 óra) lehetővé teszik, hogy a humán gyógyászatban egyszeri 2 g-os dózis a páciensek 92,2%-ában elpusztítsa a *T. vaginalis*-t [106–108]. Ez a „one shot” alkalmazási mód hatékonynak és biztonságosnak bizonyult mind kutyák [109], mind macskák [110] *giardiasis*a esetén is, 30 mg/kg dózist alkalmazva.

A nitroimidazolok közötti eltérő hatékonyságot már más paraziták esetén is megfigyelték. A szivárványos pisztrángban megtalálható *Ichthyobodo necator* ellen csupán a metronidazol és a szeknidazol volt hatékony, míg a ronidazol, dimetridazol, illetve a beznidazol hatástalannak bizonyultak a kórokozó ellen [111].

A különböző 5-nitroimidazolok ellen a *T. foetus* képes keresztrezisztenciát kialakítani. Egy tanulmány során fiatal abesszin kandúr macskákat 3 különböző hatóanyaggal kezeltek emelkedő dózisban. Az első kúra során az állatok metronidazol kaptak 20-32 mg/ttkg dózisban napi egyszer, több héten keresztül, amelynek hatására a második kúra, amelyben az állatok ronidazol kaptak, az ajánlott dózis (30 mg/ttkg napi egyszer, 2 héten át) többszörösében (35-60 mg/ttkg napi kétszer, 2 héten át) teljesen hatástalan volt a paraziták fertőzöttség kezelésében. Ezt követően alkalmaztak egy harmadik kúrát is 50 mg/ttkg tinidazollal napi kétszer, 2 héten át, amely szintén hatástalan volt. Mindhárom kúra alatt javult a bélsár konzisztenciája, és a macskák nem mutattak semmilyen idegrendszeri tünetet, még a magas dózisú ronidazol kúra esetén sem [112].

Ezt a keresztrezisztenciát az ember *T. vaginalis* fertőzöttségének kezelésében nem figyelték meg ilyen mértékben. Az Amerikai Egyesült Államokban a metronidazol kezelések 10%-a hatástalan a betegségre, azonban ezekben az esetekben nagyon hatékony alternatív megoldás a tinidazol [113].

2.5. Alternatív kezelési lehetőségek

Az α -tomatine egy paradicsomban (*Solanum lycopersicum*) előforduló, természetes glikoalkaloid, mely igen magas antiparazitikus hatékonysággal rendelkezik, a szarvasmarhából (2,7 $\mu\text{g/ml}$ MIC) és a macskából (2 $\mu\text{g/ml}$ MIC) származó *T. foetus* törzsek esetén egyaránt [114]. A különböző teakivonatok és egyedi tea összetevők (katekinok a zöld teában, és theaflavinok a fekete teában) esetén is mutattak ki *T. foetus* ellenes hatást, mivel a magas theaflavin tartalmú fekete tea kivonat képes volt gátolni a macskából, illetve szarvasmarhából származó törzsek szaporodását egyaránt [115].

A burgonyában (*Solanum tuberosum*) előforduló glikoalkaloidok, az α -szolanin és az α -chaconine szintén képesek előltni mindkét *T. foetus* genotípust, előbbi hatóanyag esetén 10 $\mu\text{g/ml}$, utóbbi esetében 50 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációkban [116]. Egy új-kaledóniai tanulmány során 18 ott őshonos növényfaj antiparazitikus hatását vizsgálták, amelyek közül a *T. vaginalis* ellen csupán két faj mutatott aktivitást: a *Scaevola balansae* kérgének kivonata, illetve a *Myristica fatua* magjából származó kivonat 30 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban gátolta a parazita szaporodását [117].

Egy mexikói kutatás esetében a papaja (*Carica papaya*) és a kókusz (*Cocos nucifera*) metanolos kivonatai még hatékonyabbnak bizonyultak, 5,6 $\mu\text{g/ml}$ illetve 5,8 $\mu\text{g/ml}$ MIC értékek állapították meg *T. vaginalis* esetén [118]. A hagyományos török gyógyászatban használt nyugati szamócafa (*Arbutus unedo*) levelének etil-acetátos extrakciója 100%-ban meggátolta a *T. vaginalis* növekedését 0,5 mg/ml koncentrációban [119]. Az *Aframomum sceptrum*-ból származó esszenciális olajok kutatása során a β -pinene és a *caryophyllene oxid* számottevő antiprotozoális aktivitást mutattak *T. vaginalis* ellen, 0,44 mg/ml és 0,16 mg/ml koncentrációkban [120].

Az auranofinról, ami egy szerves arany vegyület bizonyították, hogy *in vitro* 2–6 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban már letális volt *T. foetus* ellen. Ez annak köszönhető, hogy a vegyület inaktíválja a thioeredoxin redukáz enzimet. *In vivo* kísérleteket is végeztek emberben *T. vaginalis* ellen, ahol egy 4 napos kúra (5 mg/kg dózist alkalmazva napi egyszer) során teljesen megszabadultak a fertőzéstől a kísérletben résztvevők, amellet, hogy semmiféle mellékhatás nem jelentkezett [121].

3. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen kutatás célja, hogy megvizsgáljuk egy magyarországi eredetű etanolos propolisz kivonat házimacskából és szarvasmarhából izolált *T. foetus* ellenes *in vitro* hatékonyságát, megállapítsuk a ronidazol hatékonyságát a macskából származó genotípus esetén, valamint, hogy összehasonlítsuk a metronidazol, ronidazol, tinidazol és szeknidazol hatóanyagok hatékonyságbeli különbségét a szarvasmarhából származó törzs esetén. Továbbá, hogy összevessük a propolisz kivonat és a ronidazol hatóanyag hatékonyságát a kétféle gazdaállatból származó *T. foetus* esetében.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. A vizsgált paraziták és a propolisz eredete

A Parazitológia Tanszék segítségével egy korábban igazoltan fertőzött, budapesti macskatenyészet tíz darab állatából vettünk steril vattapálca segítségével bélsármintát, transzport médiumot tartalmazó levesbe (InPouch TF-Feline, Antelope Rd, White City, USA). A szarvasmarha eredetű törzs *T. foetus* (Riedmuller) Wenrich and Emerson ATCC 30232 törzs volt (LGC Ltd, Teddington, Middlesex, UK).

A vizsgálat során használt propolisz tinktúra az észak-alföldi régióból származott. A törzsoldat készítése 1000 g propolisz, 3000 ml 96%-os etanol és 1000 ml glicerin felhasználásával történt.

4.2. A paraziták fenntartása, szaporítása

Az InPouch mintagyűjtő rendszer állatorvosi vonalon egy speciális kombinált eszköz, mely az inkubációhoz és a kimutatáshoz nagymértékben hozzájárul, melyet a kezdeti feldúsításhoz használtunk. A tápleves többek között a *T. foetus* növekedését biztosítja a *Pentatrichomonas hominis* és a *Giardia duodenalis* 24 órát követő gátlásával, valamint az *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* és *Staphylococcus aureus* teljes gátlása révén. A minták beszállítása 35 °C-os temperált körülmények között történt. 24 órás, 37 °C-os termosztátban történő inkubálást követően inverz mikroszkóp segítségével vizsgáltuk a parazita jelenlétét. A macska eredetű tíz minta közül egy esetben sikerült kimutatnunk a parazitát. A szarvasmarha eredetű törzset vásároltuk. Ezt követően a mintákból speciális táplevesbe oltottunk át, mely az alábbi összetevőket tartalmazta:

1. *Trichomonas Cysteine peptone liver infusion medium* (CPLM) táptalaj alap – módosított: 425 ml
2. *Trichomonas* szelektív kiegészítő: 1 fiola (4 ml steril ioncserélt vízben feloldva)
3. Steril, inaktivált (56 °C-on 30 percig) pH 6-ra beállított lószérum: 70 ml

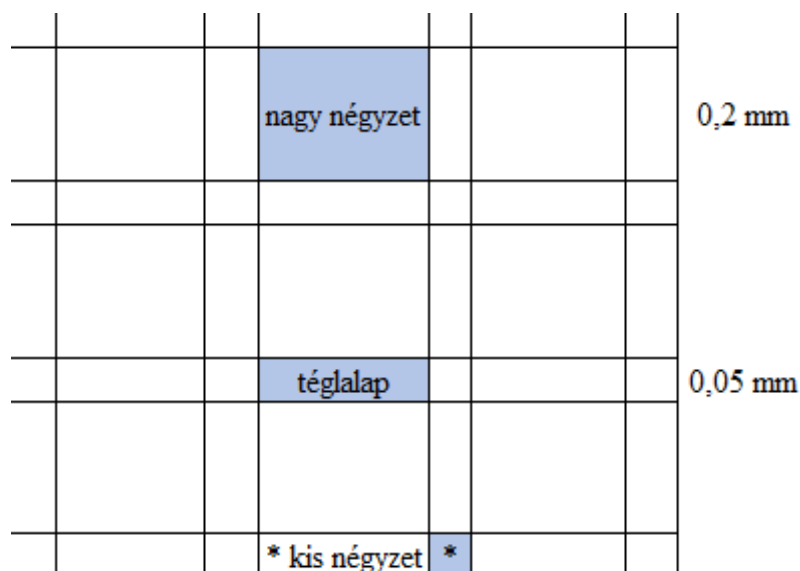
4.3. A paraziták mennyiségi meghatározása

A trophozoita mozgó alakok mennyiségi meghatározását (db/ml) Bürker-kamra (**1. ábra**) segítségével végeztük, a sejtszámláláshoz használt általános képlet segítségével. Az első számolást a beérkezést követően 24 órás inkubációt követően végeztük.

A sejtszámláláshoz használt általános képlet alapján a **nagy négyzetekhez** tartozó átlagos sejtszámot vettük, az alábbi képlet segítségével: 25 nagy négyzetben megszámláltuk a trophozoiták számát, majd átlagoltuk azt, végül megszoroztuk a hígítás mértékével - 20 µl

szuszpenzióhoz adtunk 20 µl steril fiziológiás sóoldatot, tehát kétszeres volt a hígítás és végül szorzófaktoroként $2,5 \times 10^5$ -el kellett szorozni:

$$\text{SEJTSZÁM} * \text{HÍGÍTÁS FOKA} * 2,5 \times 10^5$$



1. ábra Bürker-kamra

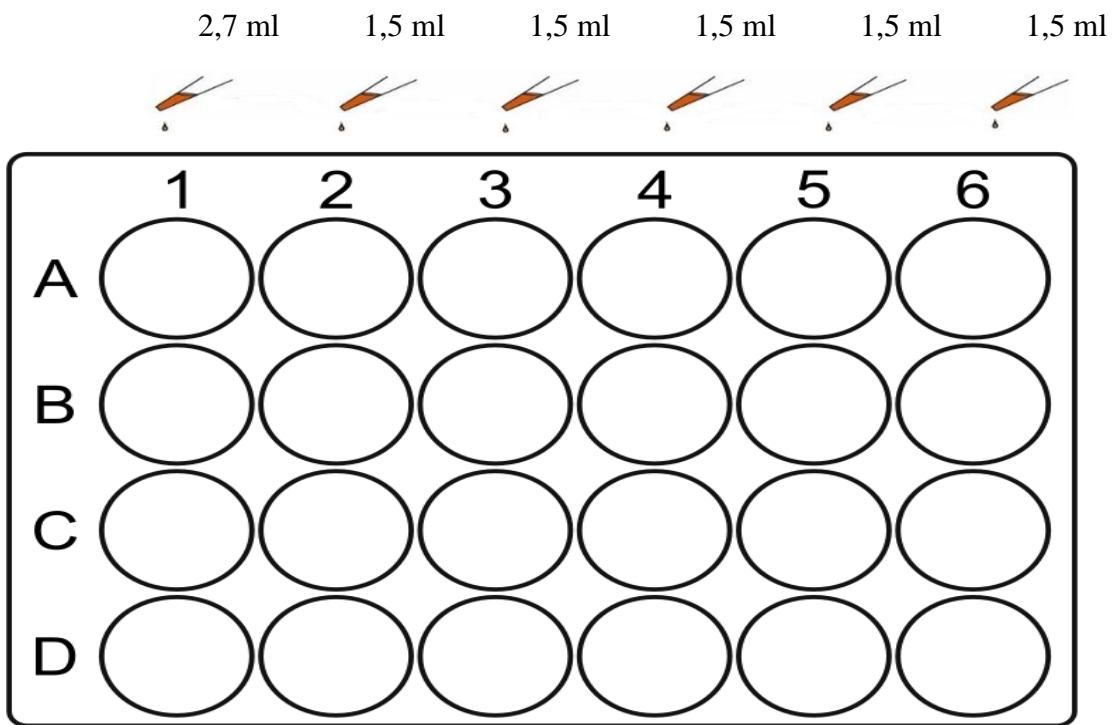
4.4. A propolisz kivonattal történő vizsgálat

A kezelés során a kontroll minta mellett 96%-os propolisz tinktúrát alkalmaztunk (**1. táblázat**). MIC érték meghatározást végeztünk, azzal a különbséggel, hogy itt nem zavarosodást vizsgáltunk, hanem a trophozoitákat számoltuk az egyes hígításokban Bürker-kamra segítségével. A vizsgálathoz 24-es sejttenyésztő lemezt (VWR International, LLC., Magyarország) használtunk.

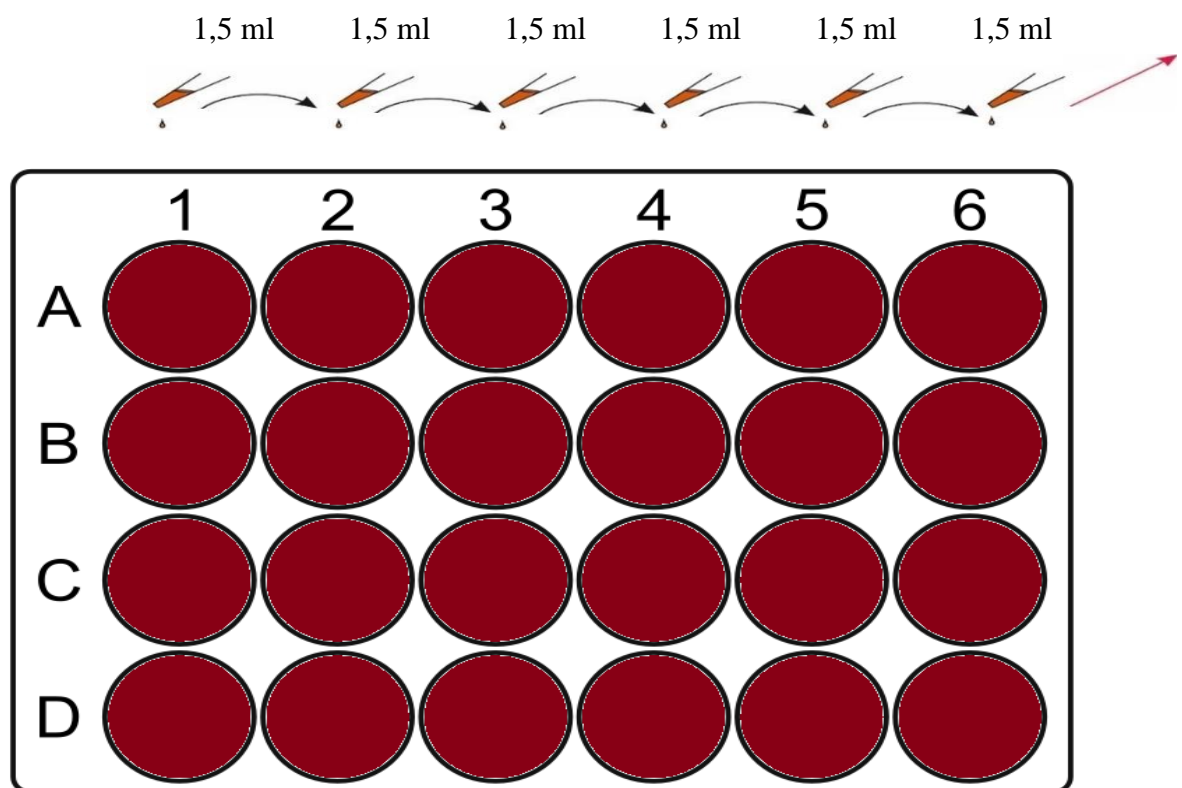
1. táblázat A propolisz törzsoldat koncentrációjának elkészítése

Anyag	Oldószer	Oldott anyag	Koncentráció
Propolisz tinktúra	3000 ml 96% etanol 1000 ml glicerin	1000 g	200 mg/ml

Emellett mindegyik minta alatt kontrollként néztük az adott hígítású oldószerrel történő kezelés hatását is, hogy el tudjuk dönteni, hogy ha van hatása a kezelésnek, az a propolisznak vagy az alkoholos oldószernek tulajdonítható-e. A vizsgálathoz a tömény propolisz törzsoldatot és a 96%-os etanolt tízszeres hígításban mértük be az első oszlopba (**2. ábra**). Ezt követően elkészítettük a propolisz kettes alapú hígítási sorát (**3. ábra**).



2. ábra: 1. lépésként a 24-es lemez első oszlopát 2,7 ml táplevessel töltöttük fel, a többi lyukba 1,5 ml táplevest mértünk

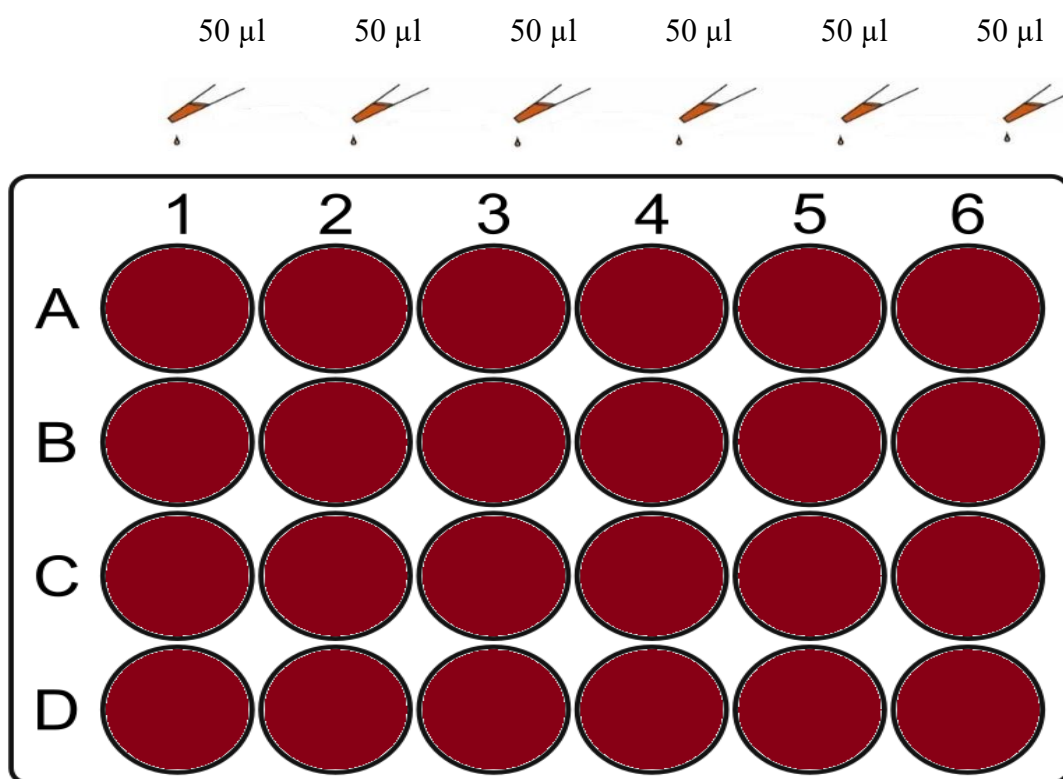


3. ábra: 2. lépésként az első lyukba 0,3 ml propolisz tinktúrát mértünk, majd elkészítettük a kettes alapú hígítási sort

A kettes alapú hígítási sor elkészítéséhez az első lyukból átmértünk 1,5 ml szuszpenziót a másodikba és szuszpendáltuk azt 2-3 alkalommal, majd kivettünk ebből 1,5 ml szuszpenziót a harmadik lyukba, szuszpendáltuk és így tovább, végül az utolsó lyukból a pipetta hegyet a felesleges 1,5 ml szuszpenzióval eldobtuk (B6 lyuk). Így egy kettes alapú hígítási sort készítettünk. Az első oszlop „A” lyukából kiindulva a propoliszos tinktúra, a „C” lyukból kiindulva a hozzá tartozó oldószer kettes alapú hígítási sorát készítettük el (2. táblázat).

2. táblázat A kiindulási propolisz tinktúra és oldószer hígítási sora (mg/ml; %)

A tömény 200 mg/ml oldat hígítási sora	Hígítás	10x	20x	40x	80x	160x	320x
	mg/ml	20	10	5	2,5	1,25	0,62
	mg/ml						
	Hígítás	640x	1280x	2560x	5120x	10240x	20480x
	mg/ml	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01
A 96%-os etanol hígítási sora	Hígítás	10x	20x	40x	80x	160x	320x
	%	9,6	4,8	2,4	1,2	0,6	0,3
	%						
	Hígítás	640x	1280x	2560x	5120x	10240x	20480x
	%	0,15	0,07	0,04	0,02	0,01	0,005



4. ábra: 4. lépés, a *T. foetus* 50 µl mennyiségnek beoltása

Végezetül 4. lépésként mindegyik lyukba 50 µl mennyiségű parazitát tartalmazó szuszpenziót oltottunk (**4. ábra**). Ezt követően a lemezeket 37 °C-os termosztátba helyeztük 5% CO₂ mellett, majd 24 órás és 48 órás inkubációt követően Bürker-kamra segítségével megszámoltuk a trophozoiták számát, öt nagy négyzet átlagát figyelembe véve.

4.5. A nitroimidazol hatóanyagokkal történő vizsgálat

Ronidazolból, metronidazolból, tinidazolból és szeknidazolból (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) 1024 µg/ml koncentrációjú törzsoldatot készítettünk 4,3 ml dimetil-szulfoxid (DMSO), 25 ml desztillált víz és 30 mg hatóanyag segítségével.

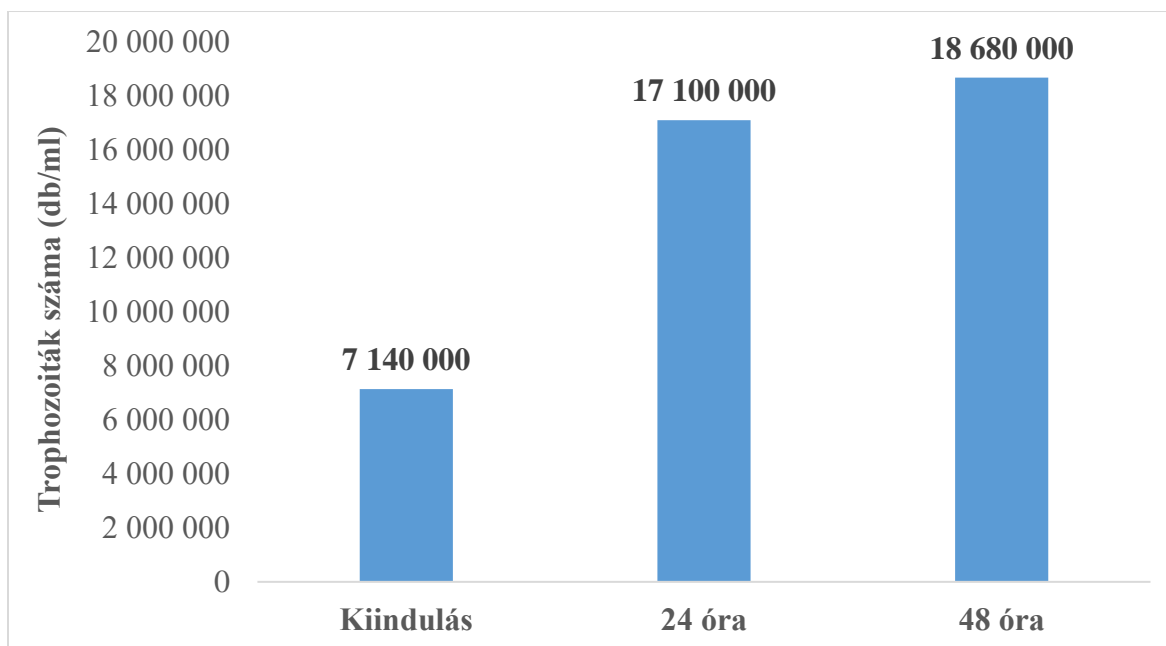
A 24-es sejtenyésztő lemez első oszlopának első lyukába a tömény törzsoldatok 2x hígítását készítettük el a CPLM táplevessel, majd ezt kettes alapon végig hígítottuk az első két sorban, alatta pedig a hatóanyag beoldására használt DMSO-t tartalmazó oldószer hígítását végeztük el hasonlóképpen. Az utolsó hígítást tartalmazó lyukakból a felesleget a pipetta hegygel eldobtuk.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Életképesség és szaporodás

5.1.1. Macska eredetű izolátum

A mintagyűjtést követően, 24, valamint 48 óra elteltével megszámoltuk a protozoák számát a mintákban. Az eredmények alapján jól látható, hogy 24 óra inkubációs időt követően jelentős mértékben, majd a 48 órás inkubációt követően már jóval kisebb mértékben nőtt a paraziták száma (**5. ábra**).

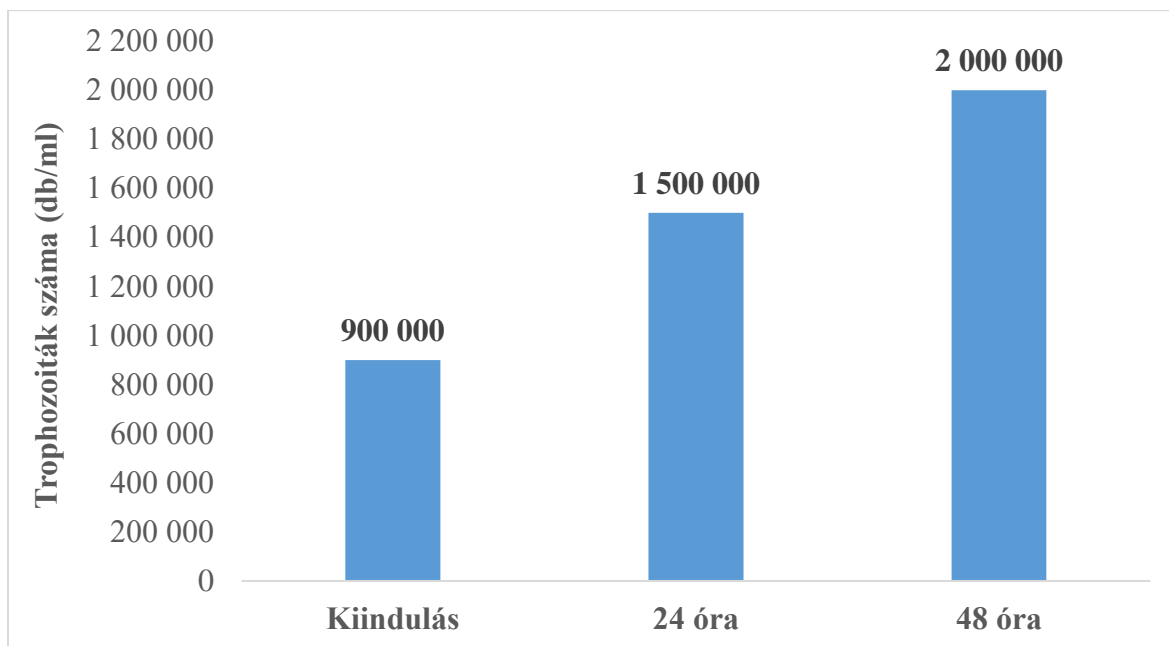


5. ábra. A trophozoiták számának alakulása 24 órás és 48 órás inkubációt követően a kiindulási parazitaszámhoz képest, 37 °C-on

A kezdeti sejtszámhoz képest 24 órás inkubációt követően 139%-os növekedés, majd 48 órás inkubációt követően még további 9%-os növekedés volt megfigyelhető, így összeségében 162%-kal nőtt a kezdeti sejtszámhoz képest a trophozoiták száma. A propoliszos vizsgálat során 24 óra alatt a kezdeti sejtszámhoz képest 194%-os növekedés, 48 órás kezelés alatt újabb 86%-os növekedés volt megfigyelhető. A ronidazollal történő kezelés során 24 óra alatt a kezdeti sejtszámhoz képest 404%-os növekedést, 48 órás kezelést követően újabb 48%-os növekedést figyeltünk meg.

5.1.2. Szarvasmarha eredetű izolátum

A törzs kioltását követően 24 óra elteltével és 48 óra elteltével megszámoltuk a protozoák számát a mintákban. Az eredmények alapján jól látható, hogy egyenletes mértékben nőtt a paraziták száma (**6. ábra**).



6. ábra. A trophozoiták számának alakulása 24 órás és 48 órás inkubációt követően a kiindulási parazitszámhoz képest, 37 °C-on

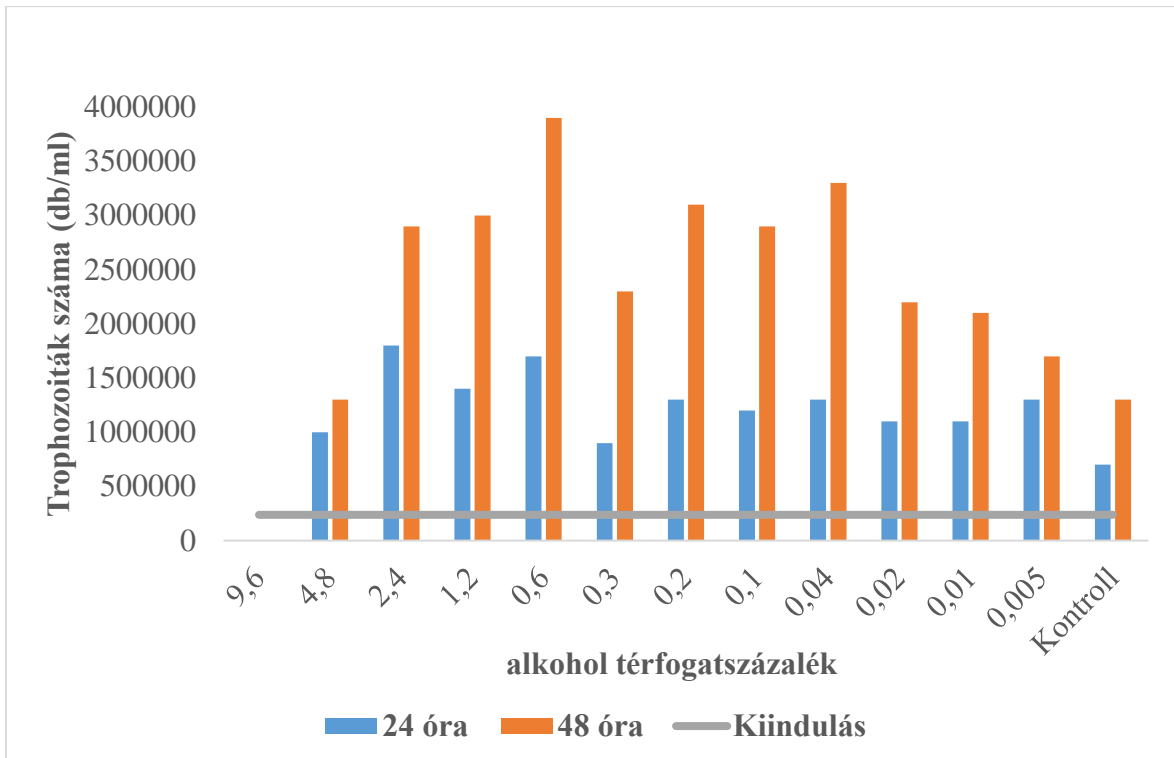
A kezdeti sejtszámhoz képest 24 órás inkubációt követően 67%-os növekedés, majd 48 órás inkubációt követően még további 33%-os növekedés volt megfigyelhető, így összeségében 122%-kal nőtt a kezdeti sejtszámhoz képest a trophozoiták száma. A vizsgálat során 24 óra alatt a beoltott sejtszámhoz képest 789%-os növekedés, 48 órás kezelés alatt viszont már 8%-os csökkenés volt tapasztalható.

5.2. A propoliszos kezelés eredményei

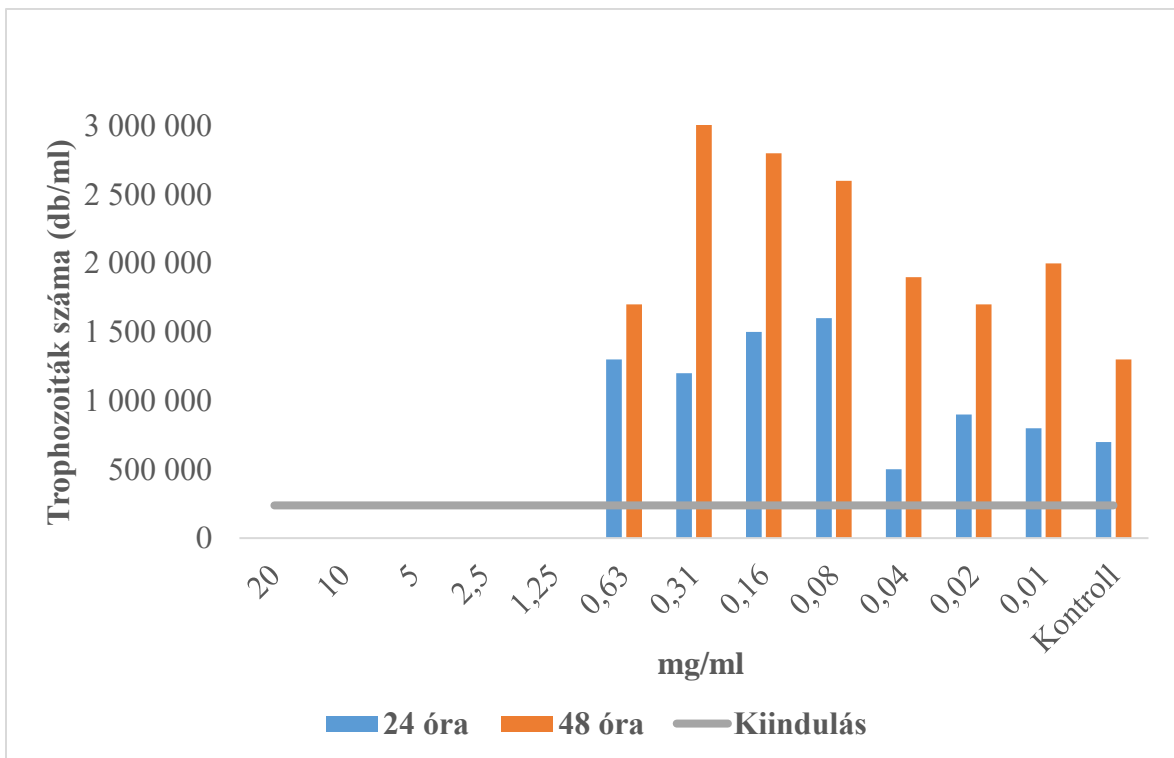
5.2.1. Macska eredetű izolátum

A **7. ábrán** jól látható, hogy a parazitákra csak a legelső - az eredeti 96%-os etanol tízszeres hígítása - tehát a 9,6%-os etanol volt letális. Az összes többi hígítást teljes mértékben jól tolerálták, sőt az alkoholt nem tartalmazó kontrollhoz képest még jobban is szaporodtak, mind a 24 órás és a 48 órás megfigyelés esetén.

A **8. ábrán** megfigyelhető, hogy 24 órás inkubációt követően az 1,25 mg/ml koncentrációt tartalmazó kezelés volt az a legkisebb hígítás, ami teljes mértékben elpusztította a parazitákat. A 48 órás kezelés hatására ez az érték nem változott. Ez a koncentráció, az eredeti propolisz kivonat koncentrációjának a 160x hígítása volt.



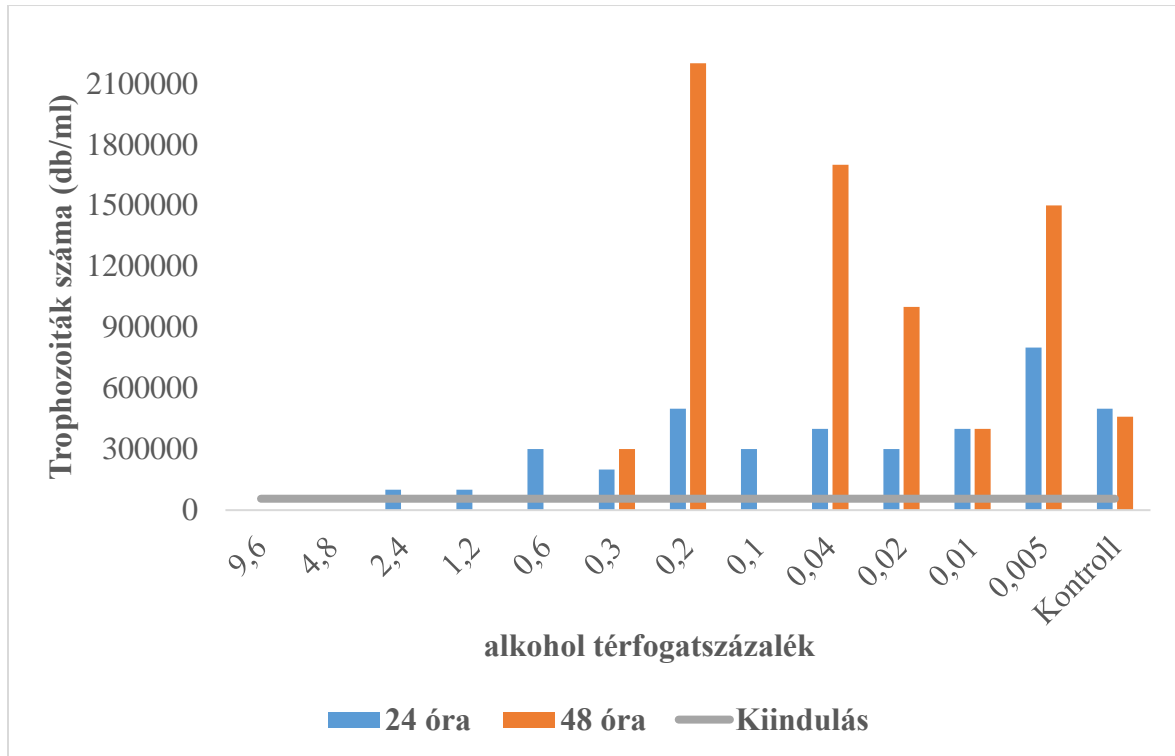
7. ábra Az alkoholos oldószer (térfogatszázalék) kettes alapú hígítási sorában meghatározott trophozoita szám alakulása 24 és 48 órás kezelés során



8. ábra A propolisz kivonat kettes alapú hígítási sorának hatékonysága (mg/ml) 24 és 48 órás kezelést követően

5.2.2. Szarvasmarha eredetű izolátum

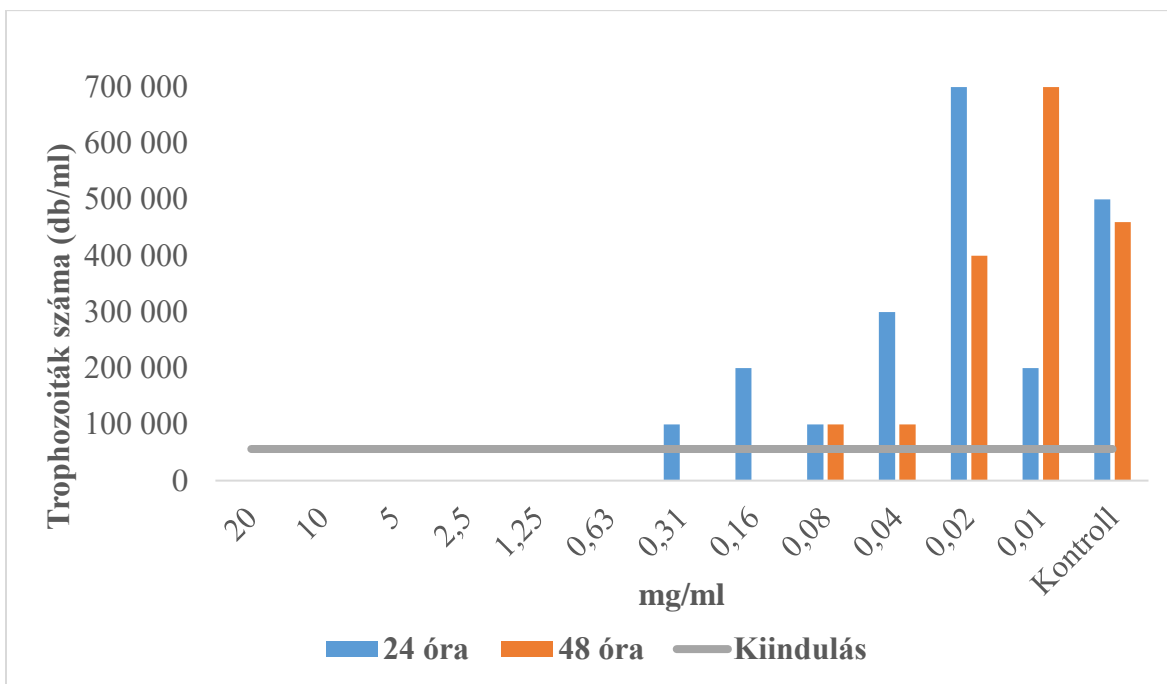
A 9. ábrán jól látható, hogy a parazitákra 24 óra alatt a 4,8%-os etanol volt letális, az összes többi hígítást teljes mértékben jól tolerálták. A 48 órás inkubációs időt követően a kezdetben is kevés életképes parazitát tartalmazó mintában már nem fedeztünk fel élő parazitát, ami feltételezhetően a kontroll csoportban is megfigyelhető csökkenő sejtszámmal magyarázható, azonban voltak kiugró minták, melyben a parazitaszám nagymértékű növekedése volt megfigyelhető.



9. ábra Az alkoholos oldószer (térfogatszázalék) kettes alapú hígítási sorában meghatározott trophozoita szám alakulása 24 és 48 órás kezelés során

A 10. ábrán látható, hogy 24 órás inkubációt követően a 0,63 mg/ml koncentrációt tartalmazó kezelés volt az a legkisebb hígítás, ami teljes mértékben elpusztította a parazitákat. A 48 órás kezelés hatására ez az érték 0,16 mg/ml koncentrációra csökkent. Az előbbi koncentráció az eredeti propolisz kivonat koncentrációjának a 320x hígítása volt, utóbbi koncentráció pedig az 1280x hígítása volt.

Tehát összehasonlítva, a macska eredetű törzs jobban tolerálta az etanolt (9,6%), a szarvasmarha eredetű törzs viszont érzékenyebb volt rá (4,8%). A propolisz kezelés előbbinél 1,25 mg/ml koncentrációban teljesen eradikálta a parazitákat, utóbbi esetben viszont már 0,63 mg/ml is elegendő volt ehhez, mely 48 óra alatt tovább csökkent 0,16 mg/ml koncentrációra.

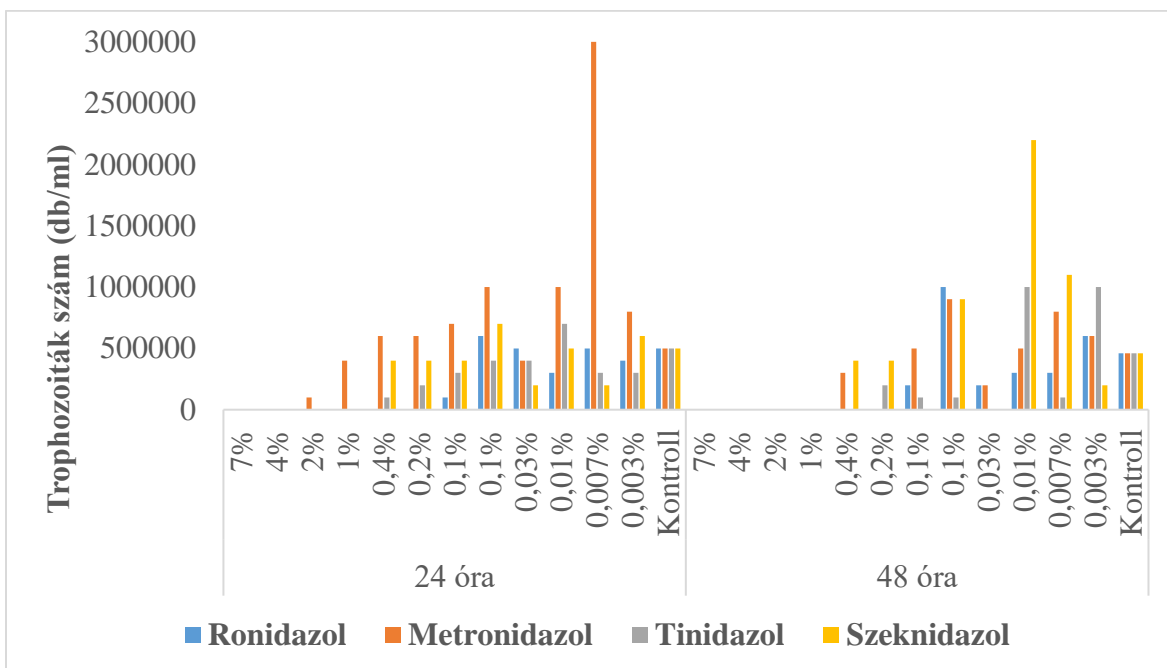


10. ábra A propolis kivonat kettes alapú hígítási sorának hatékonysága (mg/ml) 24 és 48 óras kezelést követően

5.3. A nitroimidazolokkal történő kezelés eredményei

5.3.1. A DMSO-t tartalmazó oldószer hatása

A DMSO jelentős parazitaellenes hatását csak a szarvasmarha eredetű törzs vizsgálatai során tapasztaltuk, a macskából származó mintával történő vizsgálatok során nem.

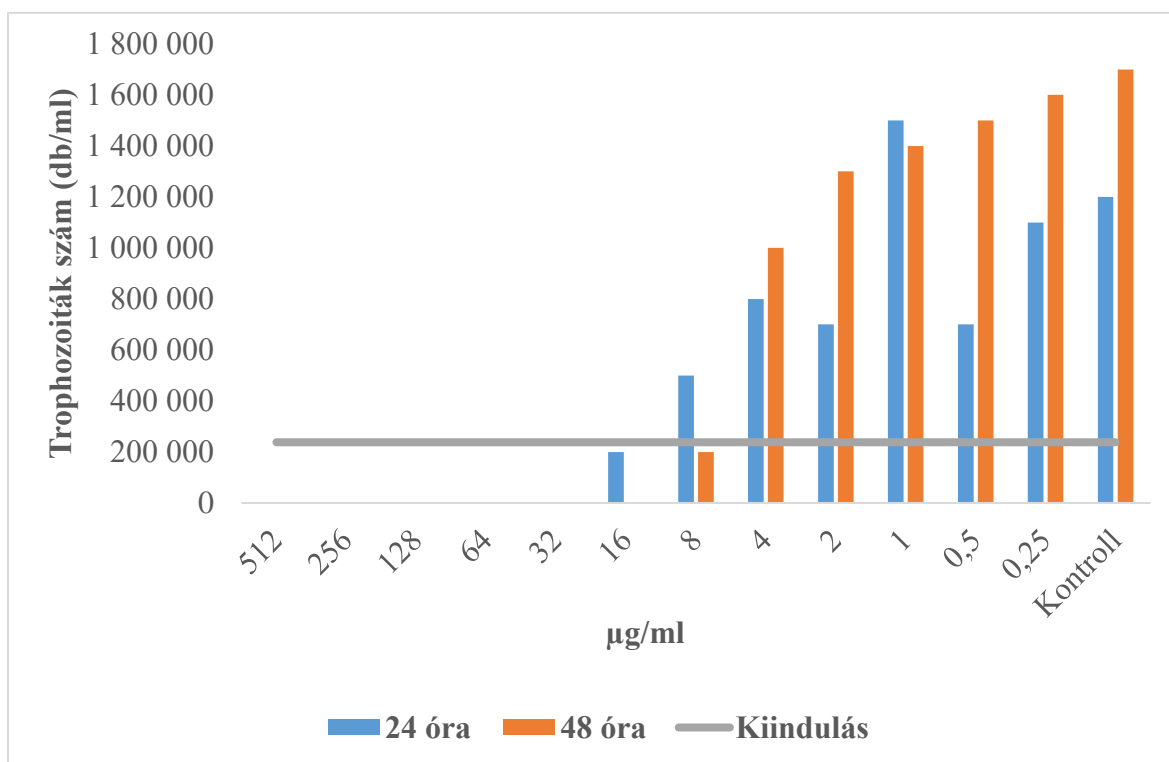


11. ábra A DMSO oldószer (térfogatszázalék) kettes alapú hígítási sorának protozoaellenes hatása 24 és 48 óras kezelést követően a szarvasmarha eredetű minták esetén

A nitroimidazolok törzsoldatának elkészítésekor a hatóanyag oldásához a desztillált víz mellett DMSO-t használtunk 14%-os arányban. Mindegyik hatóanyag alatt végeztünk csak oldószert tartalmazó kezelést, a hatóanyagos hígításhoz hasonlóan. Jól látható, hogy a legtöbb esetben a DMSO 1%-os koncentrációig parazitacid hatású volt, ezt követően a paraziták látható módon felszabadultak a gátló hatás alól és egyre nagyobb számot értek el a táplevesben. Metronidazol esetén 24 órás kezelés alatt még a 2%-os és 1%-os DMSO oldatban is találtunk élő parazitákat, azonban 48 órás kezelésre ezek is eltűntek (**11. ábra**).

5.3.2. Ronidazol hatékonysága macska eredetű izolátum esetén

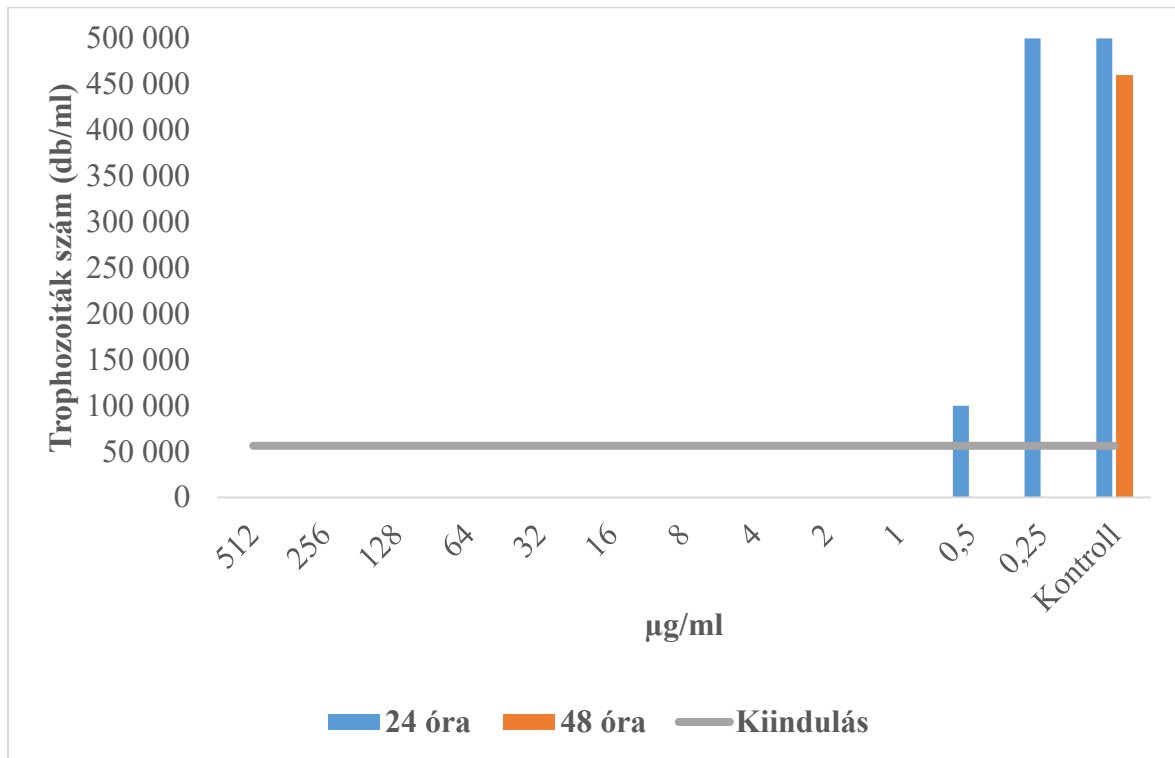
A **12. ábrán** látható, hogy a 24 órás ronidazol kezelés hatására 32 $\mu\text{g/ml}$ volt az a legkisebb gátló koncentráció, ami teljes mértékben elpusztította a parazitákat; 48 órás kezelés hatására már a 16 $\mu\text{g/ml}$ koncentráció is hatékonynak bizonyult. Ronidazol jelenlétében jól látható még a 8 $\mu\text{g/ml}$ és a 4 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációk esetén is a hatóanyag parazitaellenes hatása, mely alól a koncentráció hígulásával folyamatosan szabadulnak fel a paraziták.



12. ábra Ronidazol hatóanyag ($\mu\text{g/ml}$) kettes alapú hígítási sorának hatására 24 és 48 órás kezelés után bekövetkező trophozoita szám változás

5.3.3. Ronidazol hatékonysága szarvasmarha eredetű izolátum esetén

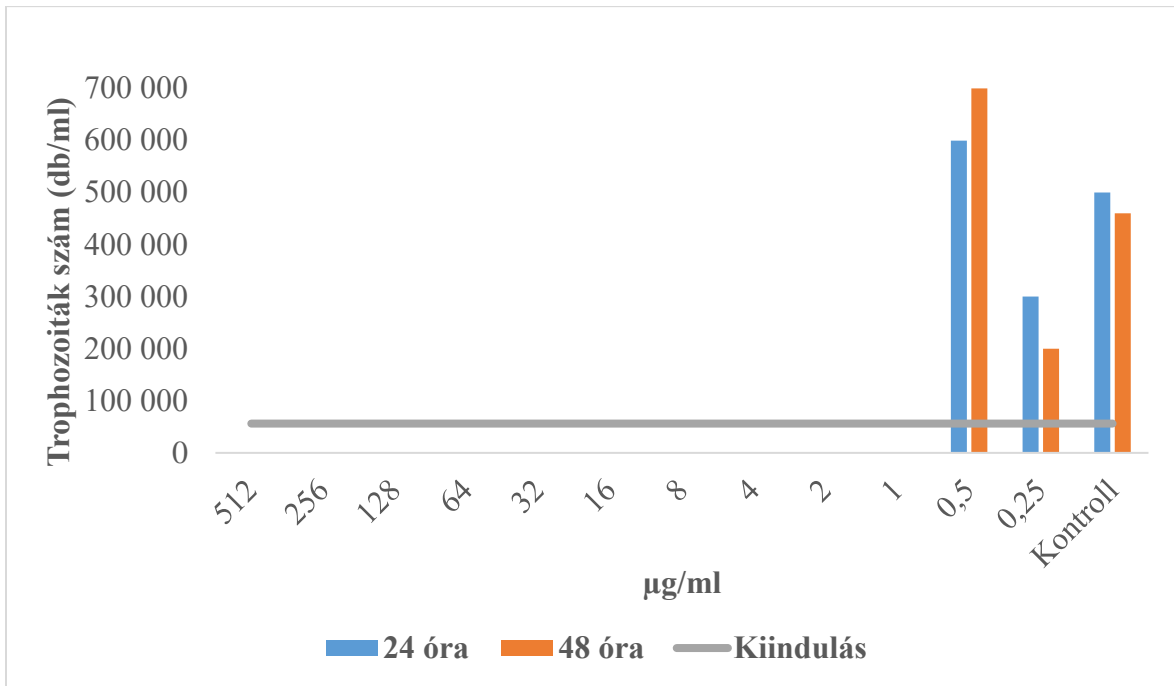
Szarvasmarha esetén a **13. ábrán** látható, hogy 24 órás ronidazol kezelés hatására 1 µg/ml az a legkisebb gátló koncentráció, ami teljes mértékben elpusztította a parazitákat; 48 órás kezelés hatására már <0,25 µg/ml koncentráció is hatékonynak bizonyult.



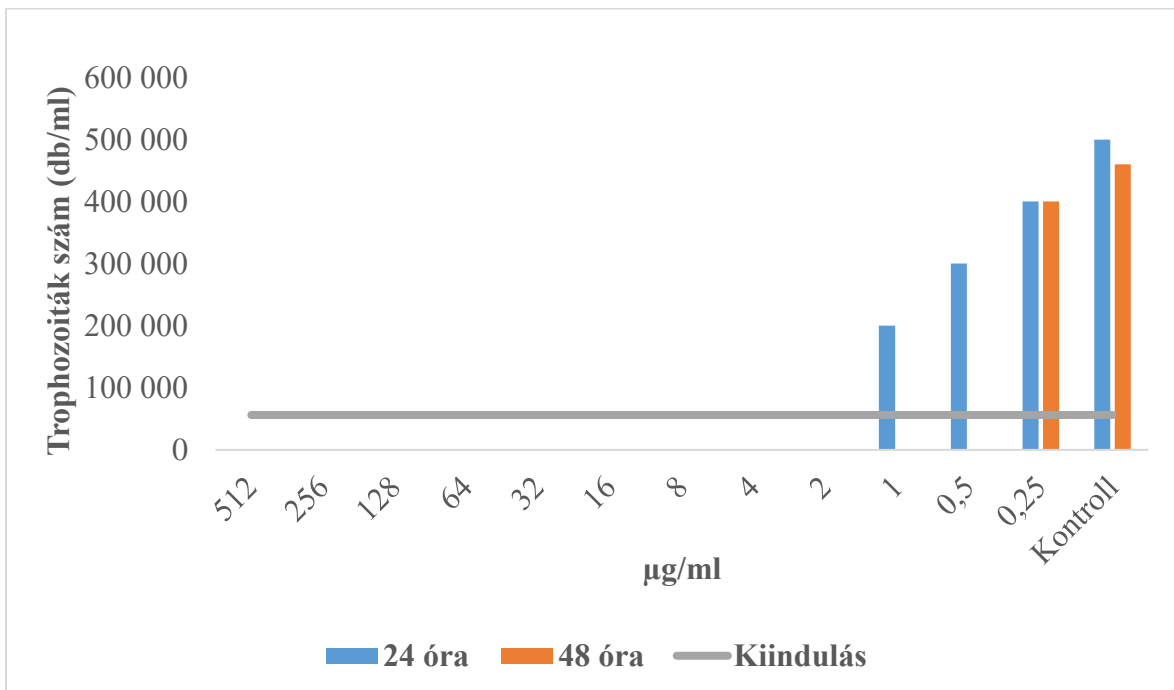
13. ábra Ronidazol hatóanyag (µg/ml) kettes alapú hígítási sorának hatására 24 és 48 órás kezelés után bekövetkező trophozoita szám változás

5.3.4. Egyéb nitroimidazolok hatékonysága szarvasmarha eredetű izolátum esetén

Metronidazol esetén a **14. ábrán** látható, hogy mind a 24 órás és 48 órás kezelés hatására az 1 µg/ml hatóanyag koncentráció bizonyult hatékonynak, mely a parazitákat teljes mértékben elpusztította. A 0,5 µg/ml koncentrációban a gátlás alól felszabadulva a parazitaszám jelentős mértékben meghaladta a kontroll csoportét. A kiindulási parazitaszámhoz képest jelentős mértékű volt a paraziták szaporodása a táplevesben, mind a kontrollban és a már nem hatékony metronidazol tartalmazó koncentrációkban is. Hatékonyság szempontjából a ronidazol és metronidazol 24 órás kezelés során hasonló eredményeket mutatnak, 48 órás kezelés során azonban a ronidazol hatékonysága tovább fokozódik.



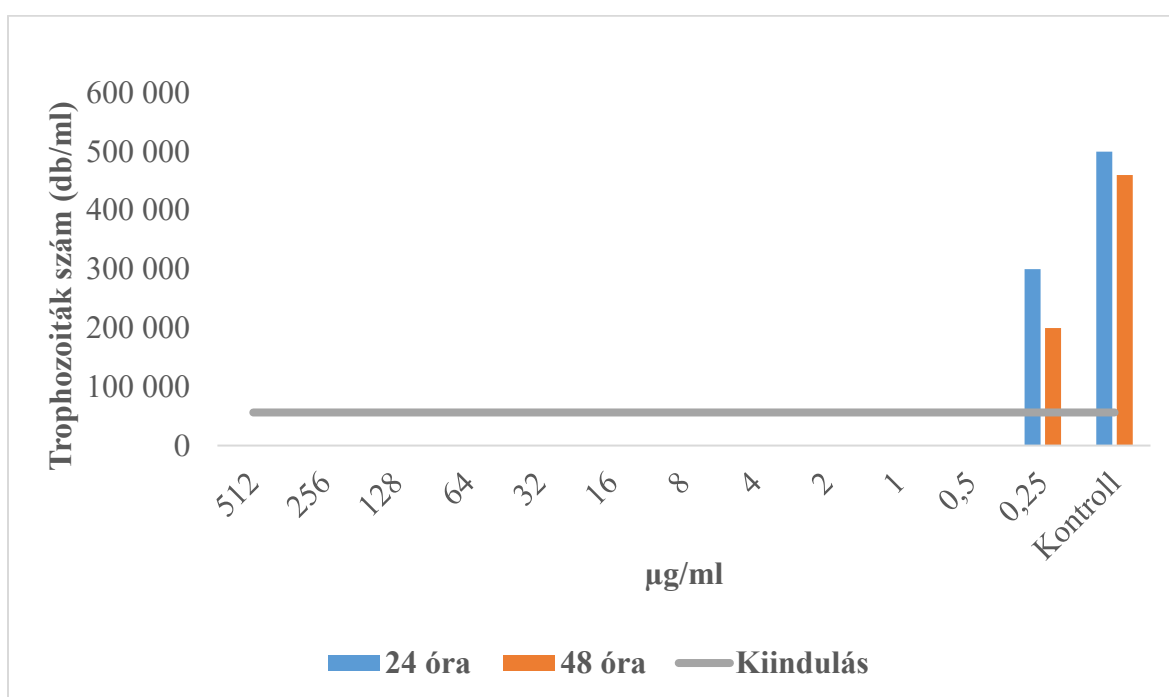
14. ábra Metronidazol hatóanyag (µg/ml) kettes alapú hígítási sorának hatására 24 és 48 órás kezelés után bekövetkező trophozoita szám változás



15. ábra Tinidazol hatóanyag (µg/ml) kettes alapú hígítási sorának hatására 24 és 48 órás kezelés után bekövetkező trophozoita szám változás

Tinidazol esetén a **15. ábrán** látható, hogy 24 órás kezelés hatására a paraziticid hatás 2 µg/ml volt, 48 órás kezelés hatására azonban ez az érték 0,5 µg/ml koncentrációra csökkent. Tehát hatékonyság szempontjából 24 órás kezelés során a ronidazol, metronidazol, tinidazol hatékonysági sor állapítható meg. 48 órás kezelés hatására azonban a tinidazol a ronidazolhoz hasonló hatékonyság fokozódást mutat.

Szeknidazol esetén a **16. ábrán** látható, hogy mind a 24 órás és 48 órás kezelés során a hatékony paraziticid hatás 0,5 µg/ml koncentráció esetén figyelhető meg. A 0,25 µg/ml koncentráció még jelentősen gátolja a paraziták szaporodását, hiszen a parazitaszám a kontroll csoporthoz képest jelentősen elmarad.



16. ábra Szeknidazol hatóanyag (µg/ml) kettes alapú hígítási sorának hatására 24 és 48 órás kezelés után bekövetkező trophozoita szám változás

Összességében elmondhatjuk, hogy a szarvasmarha eredetű törzs nitroimidazol hatóanyagokra vizsgált hatékonysági sorában 24 órás kezelés alatt a leghatékonyabbnak a szeknidazol bizonyult (0,5 µg/ml); ezt a ronidazol (1 µg/ml), metronidazol (1 µg/ml) és tinidazol (2 µg/ml) hatóanyagok követték. A 48 órás kezelés során további hatékonyság növekedést mutatott a ronidazol (<0,25 µg/ml) és a tinidazol (0,5 µg/ml).

6. KÖVETKEZTETÉSEK

A propolisz hatékonyságát taglaló összehasonlító szakirodalmi adat macska- és szarvasmarha eredetű *T. foetus* esetén nem áll rendelkezésre. Vizsgálataink során a propoliszos kezelés előbbi esetben 1250 µg/ml koncentrációban teljesen eradikálta a parazitát, utóbbi esetében már 630 µg/ml is elegendő volt, mely 48 óra alatt tovább csökkent 16 µg/ml koncentrációra. *Trichomonas vaginalis* esetén Sena-Lopes és mtsai. brazil propolisz 24 órás kezelése esetén 500 µg/ml koncentrációnál teljes eradikációt tapasztaltak [41], kubai propolisz esetén 3,2-9,1 µg/ml közötti hatékony koncentrációt mutattak ki [42]. *Trichomonas gallinae* protozoával szemben egyiptomi propolisz vizes oldata 75 000 µg/ml koncentrációban 24 óra után, 50 000 µg/ml koncentrációban 48 óra után képes volt a protozoákat elpusztítani [43]. Hazai vizsgálatok során propolisz etanolos kivonata esetén 1100-5000 µg/ml közötti koncentrációban találtak parazitaellenes hatékonyságot [44].

A szakirodalomban számos protozoa esetén bizonyították a propolisz kivonatainak hatékonyságát, többek között *Trypanosoma cruzi* esetén brazil propolisz 31-59,84 µg/ml [7], illetve 421-1437 µg/ml [34], kubai propolisz 1,6-9 µg/ml [29], portugál propolisz 6,2-7,7 µg/ml [35]; *Trypanosoma brucei* esetén nigériai propolisz 3,9-74,7 µg/ml [36], brit propolisz 2,9-22,1 µg/ml [33], valamint 3-14,04 µg/ml [37], bolgár propolisz 3,6-6,28 µg/ml, litván propolisz 16,1-25 µg/ml [33], szaúdi propolisz 4,6 µg/ml [38], portugáliai propolisz 1,7 µg/ml és 3,8 µg/ml [35]. *Trypanosoma congolense* esetén brit propolisz 2,13-35,7 µg/ml, bolgár propolisz 1,96-3,69 µg/ml, litván propolisz 23,4-30,9 µg/ml koncentrációkat írtak le [33]. *Plasmodium falciparum* esetén is számos tanulmány készült, iráni eredetű propoliszt vizsgálva 27,1-80 µg/ml [39], kubai propoliszt vizsgálva 0,2-12,5 µg/ml [29], líbiai propolisz esetén 12,4-49,2 µg/ml közötti [15], egy másik kutatásban 2,3-63,8 µg/ml közötti [40], portugáliai eredetű propolisz kivonatokot vizsgálva 8,8 µg/ml és 30,1 µg/ml MIC értékeket állapítottak meg [35].

Összességében elmondható, hogy propolisz esetén *T. foetus* esetén más *Trichomonas* fajokhoz képest alacsonyabb hatékonyságot találtunk, azonban a kapott értékek a propolisz terápiás felhasználhatósága szempontjából relevánsak. A propolisz kivonatok hatékonysága többek között földrajzi környezet alapján nagy diverzitást mutatnak, ezért a jövőben mindenképpen érdemes több földrajzi területről származó propolisz kivonat tesztelése, valamint több *T. foetus* izolátumon elvégezni a vizsgálatot. A földrajzi különbségeket támasztja alá, hogy korábbi kutatásaink során ugyanezzel a kivonattal hasonlóan magas értékeket találtunk *Trichomonas gallinae* esetén (1100-5000 µg/ml). A továbbiakban érdemes *in vivo* kísérletek során a propolisz farmakokinetikai tulajdonságait is vizsgálni.

Ronidazol hatékonyságának vizsgálata során a macska eredetű törzsnél 24 órás kezelés során 32 µg/ml koncentráció pusztította el a parazitákat, 48 órás kezelés hatására már a 16 µg/ml koncentráció is hatékonynak bizonyult. Ehhez képest a szarvasmarha eredetű törzsnél 24 órás kezelés hatására 1 µg/ml koncentráció teljes mértékben elpusztította a parazitákat, 48 órás kezelés hatására pedig <0,25 µg/ml koncentráció is hatékonynak bizonyult. Ezzel szemben Gookin és mtsai. 2006-ban a macskából származó genotípus érzékenységét vizsgálva ronidazolra kimutatták, hogy 0,1 µg/ml-es koncentráció felett a hatóanyag teljes mértékben képes volt elpusztítani a parazitát [94]. Szintén Gookin és mtsai. 2010-ben minimális letális koncentráció (MLC) értékeket határoztak meg macskából származó törzsek esetén, 1 µg/ml koncentrációban nem rezisztens törzsek esetében, míg rezisztens törzseknél ez az érték 100 µg/ml volt [112]. Szarvasmarha esetén ronidazolra nem áll rendelkezésre összehasonlító szakirodalmi adat. Gookin és mtsai. vizsgálták a tinidazol hatékonyságát is a macskában előforduló törzsrre, amely ≥ 1 µg/ml-es koncentrációk esetén hatékonyan gátolta a parazita szaporodását [105]. Andrews és munkatársai 1994-ben vizsgálták a metronidazol hatékonyságát macskából származó törzsek esetén és 10 µg/ml koncentrációt találtak hatékonynak [122].

Összességében elmondhatjuk, hogy az általunk vizsgált macska eredetű törzs esetén tapasztalt magas (32 µg/ml) MIC érték valószínűleg rezisztencia következménye, ugyanakkor a szarvasmarha eredetű törzs esetén ehhez képest alacsony értéket mutattunk ki (1 µg/ml). Szarvasmarha eredetű törzs esetén elsőként vizsgáltuk a ronidazol hatékonyságát.

Vizsgáltuk a szarvasmarha eredetű törzs egyéb nitroimidazol hatóanyagokra való érzékenységét is. Az egyes hatóanyagok között hatékonysági sort felállítva a 24 órás kezelés során a leghatékonyabbnak a szeknidazol bizonyult (0,5 µg/ml), összehasonlító szakirodalmi adat nem áll rendelkezésre. Vizsgálatainkban a hatékonysági sorban ezt a ronidazol és metronidazol követte 1-1 µg/ml koncentrációban. Love és mtsai. egy 2017-es tanulmány során metronidazolt alkalmazva 0,5 µg/ml koncentrációban mutattak ki hatékonyságot a szarvasmarhában található genotípus esetén [92]. Rivero és mtsai. 2019-ben szintén a metronidazol hatékonyságát vizsgálták szarvasmarhában található törzsekben, ennek során 2,5–5 µg/ml közötti MIC értékeket mutattak ki, míg anaerob körülmények között 1,25 and 2,5 µg/ml közötti eredményeket kaptak [88]. Vizsgáltuk továbbá a tinidazol hatóanyagot is, mely 2 µg/ml koncentrációban mutatott hatékonyságot, azonban ezzel kapcsolatban sem áll rendelkezésre összehasonlítható szakirodalmi adat. A 48 órás kezelés során további hatékonyságnövekedést tapasztaltunk a ronidazol (<0,25 µg/ml) és a tinidazol (0,5 µg/ml) hatóanyagok esetén.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az állategészségügyi szempontból jelentős trichomoniázisok kezelési lehetőségei korlátozottak, amelynek oka egyrészt az engedélyezett készítmények hiánya, másrészt az egyre gyakrabban megjelenő rezisztencia. A *T. foetus* elhúzódó, vastagbél eredetű hasmenést okozó parazita macskáknál, mely sokszor élethosszig tartó krónikus fertőzést is képes okozni. Kezelésére az egyetlen megfelelő hatékonyságú szer a nitroimidazolok közé tartozó ronidazol, mely macskákra nincs engedélyezve, egyes egyedekben mellékhatásként pedig idegrendszeri tüneteket okozhat. A metronidazol és a tinidazol nem képes teljes mértékben eradikálni a parazitát. A szarvasmarhák *T. foetus* okozta vetélése jelentős gazdasági károkat okoz világszerte, a nitroimidazolok használata azonban élelmiszertermelő állatokban tiltott, azok potenciális karcinogén hatása miatt. A fenti szempontok alapján új, alternatív gyógymódokra van szükség.

Jelen kutatás célja, hogy meghatározzuk magyarországi eredetű propolisz tinktúra, és referenciaként nitroimidazol hatóanyagok hatékonyságát macska és szarvasmarha eredetű *T. foetus* izolátumok esetén. Vizsgálataink során minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározás módszerrel kettes alapú hígítási sort készítve vizsgáltuk a propolisz tinktúra, ronidazol, metronidazol, tinidazol és szeknidazol hatóanyagok parazitára gyakorolt hatását. Ezen kívül ezekkel párhuzamosan megvizsgáltuk az oldószerként használt etanol és DMSO oldatok ugyanolyan hígítási sorának esetleges befolyásoló hatását.

Kimutattuk, hogy a hazai propolisz tinktúra hatékonyan képes elpusztítani a *T. foetus* protozoát, melyhez a macska eredetű törzs esetén 1,25 mg/ml, a szarvasmarha eredetű törzs esetén pedig 0,63 mg/ml koncentráció is elegendő volt. A propolisz oldószerként használt etanolt a macska eredetű törzs jobban tolerálta (96 mg/ml), a szarvasmarha eredetű törzs viszont érzékenyebb volt rá (48 mg/ml). A macska eredetű törzs ronidazol hatóanyagra jóval kevésbé volt érzékeny (32 µg/ml), mint a szarvasmarha eredetű törzs (1 µg/ml). A nitroimidazolok oldásához használt DMSO hatása a macska eredetű törzs esetén elhanyagolható volt, a szarvasmarha eredetű törzs esetén viszont 1%-os koncentrációig elpusztította a parazitákat.

A propolisz tinktúra hatékonysága alapján mindenképpen érdemes további *in vitro* vizsgálatokat végezni több törzssel és többféle propolisz kivonattal; valamint *in vivo* kutatásokat végezni, annak hatékonyságának, valamint farmakokinetikai tulajdonságainak feltérképezése érdekében.

8. SUMMARY

The treatment options for trichomonas species of animal health importance are limited, due to a lack of authorised products and the increasing emergence of resistance. *T. foetus* is a protracted infection in cats causing diarrhoea of colonic origin, often developing into a lifelong chronic infection. The only adequately effective treatment is the nitroimidazole agent ronidazole, which is not licensed for cats and may cause neurological symptoms as an adverse reaction in some individuals. Metronidazole and tinidazole do not fully eradicate the parasite. Cattle abortions caused by *T. foetus* cause significant economic losses worldwide, but the use of nitroimidazoles in food producing animals is banned due to their potential carcinogenicity. In view of the above, new alternative treatments are needed.

The aim of the present study is to determine the efficacy of propolis tincture of Hungarian origin and nitroimidazole active substances as reference in *T. foetus* isolates of feline and bovine origin. We investigated the effects of the active substances propolis tincture, ronidazole, metronidazole, tinidazole and secnidazole on the parasite by using a two-based dilution series with a minimum inhibitory concentration (MIC) determination method. In addition, the possible influence of the same dilution series of ethanol and DMSO solutions used as solvents was investigated in parallel.

It was shown that the indigenous propolis tincture was effective in killing *T. foetus* protozoa, with a concentration of 1.25 mg/ml for the feline strain and 0.63 mg/ml for the bovine strain. The ethanol used as a solvent for propolis was better tolerated by the feline strain (96 mg/ml), whereas the bovine strain was more sensitive (48 mg/ml). The feline strain was much less sensitive to ronidazole (32 µg/ml) than the bovine strain (1 µg/ml). The effect of dimethyl sulphoxide (DMSO) used to dissolve the nitroimidazoles was negligible in the case of the feline strain but killed the parasites up to a concentration of 1% in the case of the bovine strain.

The efficacy of propolis tincture suggests that further *in vitro* studies with several strains and several propolis extracts; and *in vivo* studies to investigate its efficacy and pharmacokinetic properties are worthwhile.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Almuhayawi MS (2020) Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi Journal of Biological Sciences* 27:3079–3086. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.016>
2. Santos LM, Fonseca MS, Sokolonski AR, Deegan KR, Araujo RPC, Umsza-Guez MA, Barbosa JDV, Portela RD, Machado BAS (2020) Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. *J Sci Food Agric* 100:1369–1382. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10024>
3. Przybyłek I, Karpiński TM (2019) Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules* 24:2047. <https://doi.org/10.3390/molecules24112047>
4. Kowacz M, Pollack GH (2020) Propolis-induced exclusion of colloids: Possible new mechanism of biological action. *Colloid and Interface Science Communications* 38:100307. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2020.100307>
5. Rivera-Yañez N, Rivera-Yañez CR, Pozo-Molina G, Méndez-Catalá CF, Reyes-Realí J, Mendoza-Ramos MI, Méndez-Cruz AR, Nieto-Yañez O (2021) Effects of Propolis on Infectious Diseases of Medical Relevance. *Biology (Basel)* 10:428. <https://doi.org/10.3390/biology10050428>
6. Silva-Carvalho R, Baltazar F, Almeida-Aguiar C (2015) Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015:e206439. <https://doi.org/10.1155/2015/206439>
7. Regueira-Neto M da S, Tintino SR, Rolón M, Coronal C, Vega MC, de Queiroz Balbino V, de Melo Coutinho HD (2018) Antitrypanosomal, antileishmanial and cytotoxic activities of Brazilian red propolis and plant resin of *Dalbergia ecastaphyllum* (L) Taub. *Food and Chemical Toxicology* 119:215–221. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.029>
8. Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A (2006) Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharm Biomed Anal* 41:1220–1234. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.03.002>
9. Farnesi AP, Aquino-Ferreira R, De Jong D, Bastos JK, Soares AEE (2009) Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genet Mol Res* 8:635–640. <https://doi.org/10.4238/vol8-2kerr023>
10. Kuropatnicki AK, Szliszka E, Krol W (2013) Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013:e964149. <https://doi.org/10.1155/2013/964149>
11. Przybyłek I, Karpiński TM (2019) Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules* 24:. <https://doi.org/10.3390/molecules24112047>
12. Daneshmand A, Sadeghi GH, Karimi A, Vaziry A, Ibrahim SA (2015) Evaluating complementary effects of ethanol extract of propolis with the probiotic on growth performance, immune response and serum metabolites in male broiler chickens. *Livestock Science* 178:195–201. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.04.012>
13. Ding J, Matsumiya T, Hayakari R, Shiba Y, Kawaguchi S, Seya K, Ueno K, Imaizumi T (2021) Daily Brazilian green propolis intake elevates blood artemipillin C levels in humans. *J Sci Food Agric*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11132>
14. Regueira-Neto M da S, Tintino SR, Rolón M, Coronal C, Vega MC, de Queiroz Balbino V, de Melo Coutinho HD (2018) Antitrypanosomal, antileishmanial and cytotoxic activities of Brazilian red propolis and plant resin of *Dalbergia ecastaphyllum* (L) Taub. *Food and Chemical Toxicology* 119:215–221. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.029>
15. Siheri W, Ebiloma GU, Igoli JO, Gray AI, Biddau M, Akrachalanont P, Alenezi S, Alwashih MA, Edrada-Ebel R, Muller S, Lawrence CE, Fearnley J, Watson DG, De Koning HP (2019) Isolation of a Novel Flavanonol and an Alkylresorcinol with Highly Potent Anti-Trypanosomal Activity from Libyan Propolis. *Molecules* 24:1041. <https://doi.org/10.3390/molecules24061041>

16. Antwi CA, Amisigo CM, Adjimani JP, Gwira TM (2019) In vitro activity and mode of action of phenolic compounds on *Leishmania donovani*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13:e0007206. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007206>
17. Volpi N (2004) Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* 25:1872–1878. <https://doi.org/10.1002/elps.200405949>
18. Mallo N, Lamas J, Leiro JM (2013) Hydrogenosome Metabolism Is the Key Target for Antiparasitic Activity of Resveratrol against *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57:2476–2484. <https://doi.org/10.1128/AAC.00009-13>
19. Duca A, Sturza A, Moacă E-A, Negrea M, Lalescu V-D, Lungeanu D, Dehelean C-A, Muntean D-M, Alexa E (2019) Identification of Resveratrol as Bioactive Compound of Propolis from Western Romania and Characterization of Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts. *Molecules* 24:3368. <https://doi.org/10.3390/molecules24183368>
20. Bolaños V, Díaz-Martínez A, Soto J, Marchat LA, Sanchez-Monroy V, Ramírez-Moreno E (2015) Kaempferol inhibits *Entamoeba histolytica* growth by altering cytoskeletal functions. *Molecular and Biochemical Parasitology* 204:16–25. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.11.004>
21. Fonseca-Silva F, Canto-Cavalheiro MM, Menna-Barreto RFS, Almeida-Amaral EE (2015) Effect of Apigenin on *Leishmania amazonensis* Is Associated with Reactive Oxygen Species Production Followed by Mitochondrial Dysfunction. *J Nat Prod* 78:880–884. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00011>
22. Sen G, Mukhopadhyay S, Ray M, Biswas T (2008) Quercetin interferes with iron metabolism in *Leishmania donovani* and targets ribonucleotide reductase to exert leishmanicidal activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61:1066–1075. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn053>
23. Bortoleti BT da S, Tomiotto-Pellissier F, Gonçalves MD, Miranda-Sapla MM, Assolini JP, Carloto AC, Lima DM, Silveira GF, Almeida RS, Costa IN, Conchon-Costa I, Pavanelli WR (2019) Caffeic acid has antipromastigote activity by apoptosis-like process; and anti-amastigote by TNF- α /ROS/NO production and decreased of iron availability. *Phytomedicine* 57:262–270. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.12.035>
24. Huang S, Zhang C-P, Wang K, Li GQ, Hu F-L (2014) Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules* 19:19610–19632. <https://doi.org/10.3390/molecules191219610>
25. Teles CBG, Moreira-Dill LS, Silva A de A, Facundo VA, de Azevedo WF, da Silva LHP, Motta MCM, Stábeli RG, Silva-Jardim I (2015) A lupane-triterpene isolated from *Combretum leprosum* Mart. fruit extracts that interferes with the intracellular development of *Leishmania (L.) amazonensis* in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15:165. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0681-9>
26. De Pablos LM, González G, Rodrigues R, García Granados A, Parra A, Osuna A (2010) Action of a Pentacyclic Triterpenoid, Maslinic Acid, against *Toxoplasma gondii*. *J Nat Prod* 73:831–834. <https://doi.org/10.1021/np900749b>
27. Maróstica Junior MR, Dausch A, Moraes CS, Queiroga CL, Pastore GM, Parki YK (2008) Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. *Food Sci Technol* 28:178–181. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000100026>
28. Asfaram S, Fakhar M, Keighobadi M, Akhtari J (2021) Promising Anti-Protozoan Activities of Propolis (Bee Glue) as Natural Product: A Review. *Acta Parasitol* 66:1–12. <https://doi.org/10.1007/s11686-020-00254-7>
29. Monzote L, Cuesta-Rubio O, Campo Fernandez M, Márquez Hernandez I, Fraga J, Pérez K, Kerstens M, Maes L, Cos P (2012) In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107:978–984. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000800003>
30. do Nascimento TG, da Silva PF, Azevedo LF, da Rocha LG, de Moraes Porto ICC, Lima e Moura TFA, Basílio-Júnior ID, Grillo LAM, Dornelas CB, Fonseca EJ da S, de Jesus Oliveira E, Zhang AT, Watson DG (2016) Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization,

- Antioxidant and Leishmanicidal Activity. *Nanoscale Research Letters* 11:301. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1517-3>
31. Machado GM de C, Leon LL, Castro SL de (2007) Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102:73–77. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007000100012>
 32. Nina N, Feresin G, Giménez A, Capusiri E, Schmeda-Hirschmann G (2016) Antibacterial and Leishmanicidal Activity of Bolivian Propolis. *Letters in applied microbiology* 62:. <https://doi.org/10.1111/lam.12543>
 33. Alotaibi A, Ebiloma GU, Williams R, Alenezi S, Donachie A-M, Guillaume S, Igoli JO, Fearnley J, de Koning HP, Watson DG (2019) European propolis is highly active against trypanosomatids including *Crithidia fasciculata*. *Sci Rep* 9:11364. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47840-y>
 34. Cunha IB da S, Salomão K, Shimizu M, Bankova VS, Custódio AR, Castro SL de, Marcucci MC (2004) Antitrypanosomal Activity of Brazilian Propolis from *Apis mellifera*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 52:602–604. <https://doi.org/10.1248/cpb.52.602>
 35. Falcão SI, Vale N, Cos P, Gomes P, Freire C, Maes L, Vilas-Boas M (2014) In Vitro Evaluation of Portuguese Propolis and Floral Sources for Antiprotozoal, Antibacterial and Antifungal Activity. *Phytotherapy Research* 28:437–443. <https://doi.org/10.1002/ptr.5013>
 36. Omar R, Igoli JO, Zhang T, Gray AI, Ebiloma GU, Clements CJ, Fearnley J, Edrada Ebel R, Paget T, de Koning HP, Watson DG (2017) The Chemical Characterization of Nigerian Propolis samples and Their Activity Against *Trypanosoma brucei*. *Sci Rep* 7:923. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01038-2>
 37. Alotaibi A, Ebiloma GU, Williams R, Alfayez IA, Natto MJ, Alenezi S, Siheri W, AlQarni M, Igoli JO, Fearnley J, De Koning HP, Watson DG (2021) Activity of Compounds from Temperate Propolis against *Trypanosoma brucei* and *Leishmania mexicana*. *Molecules* 26:3912. <https://doi.org/10.3390/molecules26133912>
 38. Alanazi S, Alenzi N, Alenazi F, Tabassum H, Watson D (2021) Chemical characterization of Saudi propolis and its antiparasitic and anticancer properties. *Sci Rep* 11:5390. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84717-5>
 39. Afrouzan H, Zakeri S, Mehrizi AA, Molasalehi S, Tahghighi A, Shokrgozar MA, Es-haghi A, Djadid ND Anti-Plasmodial Assessment of Four Different Iranian Propolis Extracts. 12
 40. Siheri W, Zhang T, Ebiloma GU, Biddau M, Woods N, Hussain MY, Clements CJ, Fearnley J, Ebel RE, Paget T, Muller S, Carter KC, Ferro VA, De Koning HP, Watson DG (2016) Chemical and Antimicrobial Profiling of Propolis from Different Regions within Libya. *PLoS One* 11:e0155355. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155355>
 41. Sena-Lopes Â, Bezerra FSB, das Neves RN, de Pinho RB, Silva MT de O, Savegnago L, Collares T, Seixas F, Begnini K, Henriques JAP, Ely MR, Rufatto LC, Moura S, Barcellos T, Padilha F, Dellagostin O, Borsuk S (2018) Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. *PLoS One* 13:e0191797. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191797>
 42. Monzote Fidalgo L, Sariago Ramos I, García Parra M, Cuesta-Rubio O, Márquez Hernández I, Campo Fernández M, Piccinelli AL, Rastrelli L (2011) Activity of Cuban propolis extracts on *Leishmania amazonensis* and *Trichomonas vaginalis*. *Nat Prod Commun* 6:973–976
 43. M. I. A, H. Hk. H, W. G.m. M, M. F. A-R (2016) STUDY THE EFFECT OF AQUEOUS EXTRACT OF PROPOLIS ON TRICHOMONAS GALLINAE, IN VITRO. *Assiut Veterinary Medical Journal* 62:82–88. <https://doi.org/10.21608/avmj.2016.169993>
 44. Csanády P (2021) Magyarországi eredetű propolisz hatékonysága galambból izolált kórokozók esetében. *Állatorvostudományi Egyetem*

45. Heine P, McGregor JA (1993) *Trichomonas vaginalis*: a reemerging pathogen. *Clin Obstet Gynecol* 36:137–144. <https://doi.org/10.1097/00003081-199303000-00019>
46. Michi AN, Favetto PH, Kastelic J, Cobo ER (2016) A review of sexually transmitted bovine trichomoniasis and campylobacteriosis affecting cattle reproductive health. *Theriogenology* 85:781–791. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.037>
47. Soper D (2004) Trichomoniasis: under control or undercontrolled? *Am J Obstet Gynecol* 190:281–290. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2003.08.023>
48. Tully TN, Lawton MPC, Dorrestein GM (2000) *Avian medicine*. Butterworth-Heinemann, Oxford Boston
49. Felleisen RS (1997) Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitology* 115 (Pt 2):111–119. <https://doi.org/10.1017/s0031182097001212>
50. Felleisen RS (1998) Comparative genetic analysis of tritrichomonadid protozoa by the random amplified polymorphic DNA technique. *Parasitol Res* 84:153–156. <https://doi.org/10.1007/s004360050374>
51. Xu WD, Lun ZR, Gajadhar A (1998) Chromosome numbers of *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis*. *Vet Parasitol* 78:247–251. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(98\)00150-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(98)00150-2)
52. Lun Z-R, Chen X-G, Zhu X-Q, Li X-R, Xie M-Q (2005) Are *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis* synonyms? *Trends in Parasitology* 21:122–125. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.12.001>
53. Slapeta J, Müller N, Stack CM, Walker G, Lew-Tabor A, Tachezy J, Frey CF (2012) Comparative analysis of *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) cat genotype, *T. foetus* (Riedmüller, 1928) cattle genotype and *Tritrichomonas suis* (Davaine, 1875) at 10 DNA loci. *Int J Parasitol* 42:1143–1149. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.004>
54. Rivera WL, Lupisan AJB, Baking JMP (2008) Ultrastructural study of a tetratrichomonad isolated from pig fecal samples. *Parasitol Res* 103:1311–1316. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1134-x>
55. Slapeta J, Craig S, McDonell D, Emery D (2010) *Tritrichomonas foetus* from domestic cats and cattle are genetically distinct. *Exp Parasitol* 126:209–213. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.04.024>
56. Sun Z, Stack C, Šlapeta J (2012) Sequence differences in the diagnostic region of the cysteine protease 8 gene of *Tritrichomonas foetus* parasites of cats and cattle. *Vet Parasitol* 186:445–449. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.001>
57. Reinmann K, Müller N, Kuhnert P, Campero CM, Leitsch D, Hess M, Henning K, Fort M, Müller J, Gottstein B, Frey CF (2012) *Tritrichomonas foetus* isolates from cats and cattle show minor genetic differences in unrelated loci ITS-2 and EF-1 α . *Vet Parasitol* 185:138–144. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.09.032>
58. Miró G, Hernández L, Montoya A, Arranz-Solís D, Dado D, Rojo-Montejo S, Mendoza-Ibarra JA, Ortega-Mora LM, Pedraza-Díaz S (2011) First description of naturally acquired *Tritrichomonas foetus* infection in a Persian cattery in Spain. *Parasitol Res* 109:1151–1154. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2359-7>
59. Kuehner KA, Marks SL, Kass PH, Sauter-Louis C, Grahn RA, Barutzki D, Hartmann K (2011) *Tritrichomonas foetus* infection in purebred cats in Germany: Prevalence of clinical signs and the role of co-infection with other enteroparasites. *Journal of Feline Medicine & Surgery* 13:251–258. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2010.12.002>
60. Bissett SA, Stone ML, Malik R, Norris JM, O'Brien C, Mansfield CS, Nicholls JM, Griffin A, Gookin JL (2009) Observed occurrence of *Tritrichomonas foetus* and other enteric parasites in Australian cattery and shelter cats. *J Feline Med Surg* 11:803–807. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.02.001>
61. Tysnes K, Gjerde B, Nødtvedt A, Skancke E (2011) A cross-sectional study of *Tritrichomonas foetus* infection among healthy cats at shows in Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica* 53:39. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-39>

62. Kingsbury DD, Marks SL, Cave NJ, Grahn RA (2010) Identification of *Tritrichomonas foetus* and *Giardia* spp. infection in pedigree show cats in New Zealand. *N Z Vet J* 58:6–10. <https://doi.org/10.1080/00480169.2010.65054>
63. Xenoulis PG, Lopinski DJ, Read SA, Suchodolski JS, Steiner JM (2013) Intestinal *Tritrichomonas foetus* infection in cats: a retrospective study of 104 cases. *J Feline Med Surg* 15:1098–1103. <https://doi.org/10.1177/1098612X13495024>
64. Yao C, Köster LS (2015) *Tritrichomonas foetus* infection, a cause of chronic diarrhea in the domestic cat. *Vet Res* 46:35. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0169-0>
65. Foster DM, Gookin JL, Poore MF, Stebbins ME, Levy MG (2004) Outcome of cats with diarrhea and *Tritrichomonas foetus* infection. *J Am Vet Med Assoc* 225:888–892. <https://doi.org/10.2460/javma.2004.225.888>
66. Kather EJ, Marks SL, Kass PH (2007) Determination of the in vitro susceptibility of feline *trichomonas foetus* to 5 antimicrobial agents. *J Vet Intern Med* 21:966–970. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2007\)21\[966:dotivs\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2007)21[966:dotivs]2.0.co;2)
67. Gookin JL, Hanrahan K, Levy MG (2017) The conundrum of feline Trichomonosis. *J Feline Med Surg* 19:261–274. <https://doi.org/10.1177/1098612X17693499>
68. Holliday M, Deni D, Gunn-Moore DA (2009) *Tritrichomonas foetus* infection in cats with diarrhoea in a rescue colony in Italy. *J Feline Med Surg* 11:131–134. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2008.06.004>
69. Kessel JF (1928) Trichomoniasis in kittens. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 22:61–80. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(28\)90155-8](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(28)90155-8)
70. Hosein A, Kruth SA, Pearl DL, Richardson D, Maggs JC, Peach HA, Peregrine AS (2013) Isolation of *Tritrichomonas foetus* from cats sampled at a cat clinic, cat shows and a humane society in southern Ontario. *J Feline Med Surg* 15:706–711. <https://doi.org/10.1177/1098612X13475617>
71. Queen EV, Marks SL, Farver TB (2012) Prevalence of selected bacterial and parasitic agents in feces from diarrheic and healthy control cats from Northern California. *J Vet Intern Med* 26:54–60. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.00843.x>
72. Yule A, Skirrow SZ, BonDurant RH (1989) Bovine Trichomoniasis. *Parasitology Today* 5:373–377. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(89\)90298-6](https://doi.org/10.1016/0169-4758(89)90298-6)
73. Yao C (2021) Control and eradication of bovine trichomonosis in Wyoming, USA by testing and culling positive bulls. *Vet Res* 52:129. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00996-w>
74. Rae DO, Crews JE (2006) *Tritrichomonas foetus*. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 22:595–611. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2006.07.001>
75. Clark BL, Parsonson IM, Dufty JH (1974) Experimental infection of bulls with *Tritrichomonas foetus*. *Aust Vet J* 50:189–191. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1974.tb02362.x>
76. Parsonson IM, Clark BL, Dufty JH (1976) Early pathogenesis and pathology of *Tritrichomonas foetus* infection in virgin heifers. *Journal of Comparative Pathology* 86:59–66. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(76\)90028-1](https://doi.org/10.1016/0021-9975(76)90028-1)
77. BonDurant RH (1997) Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Trichomoniasis in Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 13:345–361. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30346-7](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30346-7)
78. Kvasnicka WG, Taylor REL, Huang J-C, Hanks D, Tronstad RJ, Bosomworth A, Hall MR (1989) Investigations of the incidence of bovine trichomoniasis in Nevada and of the efficacy of immunizing cattle with vaccines containing *Tritrichomonas foetus*. *Theriogenology* 31:963–971. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(89\)90479-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(89)90479-2)
79. Stockdale H, Rodning S, Givens M, Carpenter D, Lenz S, Spencer J, Dykstra C, Lindsay D, Blagburn B (2007) Experimental infection of cattle with a feline isolate of *Tritrichomonas foetus*. *J Parasitol* 93:1429–1434. <https://doi.org/10.1645/GE-1305.1>

80. Stockdale HD, Dillon AR, Newton JC, Bird RC, BonDurant RH, Deinnocentes P, Barney S, Bulter J, Land T, Spencer JA, Lindsay DS, Blagburn BL (2008) Experimental infection of cats (*Felis catus*) with *Tritrichomonas foetus* isolated from cattle. *Veterinary Parasitology* 154:156–161. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.02.024>
81. Bell ET, Gowan RA, Lingard AE, McCoy RJ, Šlapeta J, Malik R (2010) Naturally occurring *Tritrichomonas foetus* infections in Australian cats: 38 cases. *Journal of Feline Medicine & Surgery* 12:889–898. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2010.06.003>
82. Hedgespeth BA, Stauffer SH, Robertson JB, Gookin JL (2020) Association of fecal sample collection technique and treatment history with *Tritrichomonas foetus* polymerase chain reaction test results in 1717 cats. *J Vet Intern Med* 34:734–741. <https://doi.org/10.1111/jvim.15727>
83. Okamoto S, Wakui M, Kobayashi H, Sato N, Ishida A, Tanabe M, Takeuchi T, Fukushima S, Yamada T, Ikeda Y (1998) *Trichomonas foetus* meningoencephalitis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 21:89–91. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1701032>
84. Meites E, Gaydos CA, Hobbs MM, Kissinger P, Nyirjesy P, Schwebke JR, Secor WE, Sobel JD, Workowski KA (2015) A Review of Evidence-Based Care of Symptomatic Trichomoniasis and Asymptomatic *Trichomonas vaginalis* Infections. *Clin Infect Dis* 61 Suppl 8:S837-848. <https://doi.org/10.1093/cid/civ738>
85. Kissinger PJ, Gaydos CA, Seña AC, Scott McClelland R, Soper D, Secor WE, Legendre D, Workowski KA, Muzny CA (2022) Diagnosis and Management of *Trichomonas vaginalis*: Summary of Evidence Reviewed for the 2021 Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines. *Clin Infect Dis* 74:S152–S161. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac030>
86. Workowski KA (2015) Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. *Clin Infect Dis* 61 Suppl 8:S759-762. <https://doi.org/10.1093/cid/civ771>
87. Tabari MA, Poźniak B, Abrishami A, Moradpour AA, Shahavi MH, Kazemi S, Youssefi MR (2021) Antitrichomonal activity of metronidazole-loaded lactoferrin nanoparticles in pigeon trichomoniasis. *Parasitol Res* 120:3263–3272. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07263-z>
88. Belen Rivero M, Emilio Luque M, Eugenia Abdala M, Elias Luna B, Di Lullo D, Eduardo Echaide I, Gabriel Carranza P, David Rivero F (2019) In Vitro Susceptibility to Metronidazole of *Tritrichomonas foetus* Bovine Isolates from Argentina. *Acta Parasitolog* 64:232–235. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00031-1>
89. Samuelson J (1999) Why Metronidazole Is Active against both Bacteria and Parasites. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1533–1541
90. Müller M (1983) Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. *Surgery* 93:165–171
91. Hernández Ceruelos A, Romero-Quezada LC, Ruvalcaba Ledezma JC, López Contreras L (2019) Therapeutic uses of metronidazole and its side effects: an update. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 23:397–401. https://doi.org/10.26355/eurrev_201901_16788
92. Love D, Fajt VR, Hairgrove T, Jones M, Thompson JA (2017) Metronidazole for the treatment of *Tritrichomonas foetus* in bulls. *BMC Vet Res* 13:107. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0999-2>
93. Skirrow S, BonDurant R, Farley J, Correa J (1985) Efficacy of ipronidazole against trichomoniasis in beef bulls. *J Am Vet Med Assoc* 187:405–407
94. Gookin JL, Copple CN, Papich MG, Poore MF, Stauffer SH, Birkenheuer AJ, Twedt DC, Levy MG (2006) Efficacy of ronidazole for treatment of feline *Tritrichomonas foetus* infection. *J Vet Intern Med* 20:536–543. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2006\)20\[536:eorfto\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2006)20[536:eorfto]2.0.co;2)
95. LeVine DN, Papich MG, Gookin JL, Davidson GS, Davis JL, Hayes RB (2011) Ronidazole pharmacokinetics after intravenous and oral immediate-release capsule administration in healthy cats. *J Feline Med Surg* 13:244–250. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2010.12.001>

96. Papich MG, Levine DN, Gookin JL, Davidson GS, Stagner WC, Hayes RB (2013) Ronidazole pharmacokinetics in cats following delivery of a delayed-release guar gum formulation. *J Vet Pharmacol Ther* 36:399–407. <https://doi.org/10.1111/jvp.12019>
97. Rush GM, Šlapeta J (2021) Evidence of self-resolution of feline trichomonosis in a pair of single household cats due to ronidazole-resistant *Tritrichomonas foetus*. *Vet Parasitol* 300:109609. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109609>
98. Gookin JL, Hanrahan K, Levy MG (2017) The conundrum of feline trichomonosis: The more we learn the "trickier" it gets. *J Feline Med Surg* 19:261–274. <https://doi.org/10.1177/1098612X17693499>
99. Gookin JL, Breitschwerdt EB, Levy MG, Gager RB, Benrud JG (1999) Diarrhea associated with trichomonosis in cats. *J Am Vet Med Assoc* 215:1450–1454
100. Lamp KC, Freeman CD, Klutman NE, Lacy MK (1999) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole antimicrobials. *Clin Pharmacokinet* 36:353–373. <https://doi.org/10.2165/00003088-199936050-00004>
101. Martinez V, Caumes E (2001) [Metronidazole]. *Ann Dermatol Venereol* 128:903–909
102. Granizo JJ, Pía Rodicio M, Manso FJ, Giménez MJ (2009) [Tinidazole: a classical anaerobical drug with multiple potential uses nowadays]. *Rev Esp Quimioter* 22:106–114
103. Fung HB, Doan T-L (2005) Tinidazole: a nitroimidazole antiprotozoal agent. *Clin Ther* 27:1859–1884. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2005.12.012>
104. Sarkiala E, Järvinen A, Välttilä S, Mero M (1991) Pharmacokinetics of tinidazole in dogs and cats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 14:257–262. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1991.tb00835.x>
105. Gookin JL, Stauffer SH, Coccaro MR, Poore MF, Levy MG, Papich MG (2007) Efficacy of tinidazole for treatment of cats experimentally infected with *Tritrichomonas foetus*. *Am J Vet Res* 68:1085–1088. <https://doi.org/10.2460/ajvr.68.10.1085>
106. (2006) Secnidazole. In: *Drugs and Lactation Database (LactMed)*. National Library of Medicine (US), Bethesda (MD)
107. Muzny CA, Schwebke JR, Nyirjesy P, Kaufman G, Mena LA, Lazenby GB, Van Gerwen OT, Graves KJ, Arbuckle J, Carter BA, McMahon CP, Eder S, Shaw J, Pandey B, Chavoustie SE (2021) Efficacy and Safety of Single Oral Dosing of Secnidazole for Trichomoniasis in Women: Results of a Phase 3, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Delayed-Treatment Study. *Clin Infect Dis* 73:e1282–e1289. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab242>
108. Muzny CA, Van Gerwen OT (2022) Secnidazole for Trichomoniasis in Women and Men. *Sex Med Rev* 10:255–262. <https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2021.12.004>
109. Cheung W, Russo C, Maher S, Malik R, Šlapeta J (2019) Successful use of secnidazole to manage a giardiasis outbreak in a shelter. *Vet Parasitol* 274:108911. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.08.005>
110. Da Silva AS, Castro VSP, Tonin AA, Brendler S, Costa MM, Jaques JA, Bertoletti B, Zanette RA, Raiser AG, Mazzanti CM, Lopes STA, Monteiro SG (2011) Secnidazole for the treatment of giardiasis in naturally infected cats. *Parasitol Int* 60:429–432. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.06.024>
111. Tojo JL, Santamarina MT (1998) Oral pharmacological treatments for parasitic diseases of rainbow trout *oncorhynchus mykiss*. III. *Ichthyobodo necator*. *Dis Aquat Organ* 33:195–199. <https://doi.org/10.3354/dao033195>
112. Gookin JL, Stauffer SH, Dybas D, Cannon DH (2010) Documentation of In Vivo and In Vitro Aerobic Resistance of Feline *Tritrichomonas foetus* Isolates to Ronidazole. *J Vet Intern Med* 24:1003–1007. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0534.x>
113. Dunne RL, Dunn LA, Upcroft P, O'Donoghue PJ, Upcroft JA (2003) Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Res* 13:239–249. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290169>

114. Liu J, Kanetake S, Wu Y-H, Tam C, Cheng LW, Land KM, Friedman M (2016) Antiprotozoal Effects of the Tomato Tetrasaccharide Glycoalkaloid Tomatine and the Aglycone Tomatidine on Mucosal Trichomonads. *J Agric Food Chem* 64:8806–8810. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04030>
115. Noritake SM, Liu J, Kanetake S, Levin CE, Tam C, Cheng LW, Land KM, Friedman M (2017) Phytochemical-rich foods inhibit the growth of pathogenic trichomonads. *BMC Complement Altern Med* 17:461. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1967-x>
116. Friedman M, Huang V, Quiambao Q, Noritake S, Liu J, Kwon O, Chintalapati S, Young J, Levin CE, Tam C, Cheng LW, Land KM (2018) Potato Peels and Their Bioactive Glycoalkaloids and Phenolic Compounds Inhibit the Growth of Pathogenic Trichomonads. *J Agric Food Chem* 66:7942–7947. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01726>
117. Desrivot J, Waikedre J, Cabalion P, Herrenknecht C, Bories C, Hocquemiller R, Fournet A (2007) Antiparasitic activity of some New Caledonian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 112:7–12. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.026>
118. Calzada F, Yépez-Mulia L, Tapia-Contreras A (2007) Effect of Mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *J Ethnopharmacol* 113:248–251. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.001>
119. Ertabaklar H, Kivçak B, Mert T, Ozensoy Töz S (2009) In vitro activity of *Arbutus unedo* leaf extracts against *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *Turkiye Parazitoloj Derg* 33:263–265
120. Cheikh-Ali Z, Adiko M, Bouttier S, Bories C, Okpekon T, Poupon E, Champy P (2011) Composition, and antimicrobial and remarkable antiprotozoal activities of the essential oil of rhizomes of *Aframomum sceptrum* K. Schum. (Zingiberaceae). *Chem Biodivers* 8:658–667. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201000216>
121. Hopper M, Yun J, Zhou B, Le C, Kehoe K, Le R, Hill R, Jongeward G, Debnath A, Zhang L, Miyamoto Y, Eckmann L, Land KM, Wrischnik LA (2016) Auranofin inactivates *Trichomonas vaginalis* thioredoxin reductase and is effective against trichomonads in vitro and in vivo. *Int J Antimicrob Agents* 48:690–694. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.020>
122. Andrews B, Mylvaganam H, Yule A (1994) Sensitivity of *Trichomonas-Vaginalis*, *Tritrichomonas-Fetus* and *Giardia-Intestinalis* to Bacitracin and Its Zinc Salt in-Vitro. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 88:704–706. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(94\)90239-9](https://doi.org/10.1016/0035-9203(94)90239-9)

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm dr. Kerek Ádám témavezetőmnek, akinek segítségére mindig számíthattam kutatásom során. Továbbá szeretném megköszönni a lehetőséget dr. Jerzsele Ákosnak, a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék vezetőjének, aki nélkül nem jöhetett volna létre ez a dolgozat.

Köszönöm a segítséget dr. Tuska-Szalay Barbarának, a Parazitológiai és Állattani Tanszék munkatársának, a kutatáshoz használt törzsek gyűjtésében.

Hálás köszönettel tartozom a NÉBIH Élelmiszer- és Takarmánybiztonsági Igazgatóságnak, dr. Tímár Attilának, illetve dr. Széll Zoltánnak, akik segítségét nyújtottak a szarvasmarhából származó törzsek beszerzésében.

Végül, de nem utolsó sorban nagyon hálás vagyok a családomnak, kedvesemnek és barátaimnak, akik mindenben támogattak és mindig számíthatok rájuk.

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott **Dr. Kerek Ádám**, mint témavezető nyilatkozom, hogy **Yurt Attila** állatorvostan-hallgató „**Magyarországi eredetű propolisz és nitroimidazol hatóanyagok *in vitro* hatékonysága *Tritrichomonas foetus* esetén**” c. dolgozata részt vehet az Állatorvostudományi Egyetem 2022. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján.

Budapest, 2022. október hó 05. nap.

.....

Dr. Kerek Ádám
témavezető

HuVetA

ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: Yurt Attila.....

Elérhetőség (e-mail cím): attila.yurt@gmail.com.....

A feltöltendő mű címe: Magyarországi eredetű propolisz és nitroimidazol hatóanyagok *in vitro* hatékonysága *Tritrichomonas foetus* esetén

A mű megjelenési adatai: TDK 2022.....

Az átadott fájlok száma: 1 db

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

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

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

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



engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,

- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

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

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

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

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

Budapest, 2022. év október hó 05. nap

aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által

működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

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

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



Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: **Yurt Attila**.....

Neptun-kódja: **JOXTM8**.....

A témavezető neve és beosztása: **Dr. Kerek Ádám, tanszéki állatorvos, PhD-hallgató**.....

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

A diplomadolgozat címe: **Magyarországi eredetű propolisz és nitroimidazol hatóanyagok in vitro hatékonysága *Trichomonas foetus* esetén**

Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2022	02	15	Szakindulom áttekintése	
2.	2022	03	15	Labormunka megkezdés	
3.	2022	04	15	Labormunka	
4.	2022	05	15	Labormunka	
5.	2022	06	15	Erdőnépryek készítése	

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

Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2022	09	12	Indulni áttekintés, anyag és nővér megírása, megkezdés	
2.	2022	10	12	Erdőnépryek öntözése, leírása	
3.	2022	11	12	Készíthetőség és az öntözhető leírása, konzultáció	
4.	2022	12	14	Diplomamunka átvétele, prezentáció elterjesztése	
5.	2023	01	9	Prezentáció gyakorlás, konzultáció	

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


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



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

A diplomamunka befogadható, védésre alkalmasnak találtam.

Hallgató aláírása: 


.....
témavezető aláírása

Tanszéki előadó aláírása:  Átvétel dátuma: 2023.06.28.

NYILATKOZAT

Alulírott Yurt Attila nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe Magyarországi eredetű propolisz és nitroimidazol hatóanyagok in vitro hatékonysága *Trichomonas foetus* esetén tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2022 évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2023.11.09

Yurt Attila 

a hallgató neve és aláírása