

# **TDK DOLGOZAT**

**Csanády Péter**

**2021**

# ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék



## Magyarországi eredetű propolisz hatékonysága galambból izolált kórokozók esetében

Készítette:

**Csanády Péter**

IV. évf. ao. hallgató

Témavezető:

Dr. Kerek Ádám

ÁTE, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, PhD-hallgató

**Budapest**

**2021**

## Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
1. Bevezetés.....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1. A propoliszról általában.....	5
2.2. A propolisz antibakteriális hatása.....	8
2.2.1. A propolisz <i>Staphylococcus</i> spp. ellenes hatékonysága.....	8
2.2.2. A propolisz <i>Enterococcus</i> spp. ellenes hatékonysága.....	10
2.2.3. A propolisz <i>E. coli</i> ellenes hatékonysága.....	11
2.2.4. A propolisz <i>S. enterica</i> ellenes hatékonysága.....	12
2.3. A propolisz gombaellenes hatása.....	13
2.4. A propolisz parazitaellenes hatása.....	15
3. Célkitűzések.....	17
4. Anyag és módszer.....	18
4.1. A propolisz törzsoldatok és a mikróbák előkészítése.....	18
4.2. A baktérium- és gombaellenes hatékonyság vizsgálata.....	19
4.3. A <i>Trichomonas gallinae</i> előkészítése.....	20
4.4. A <i>Trichomonas gallinae</i> ellenes hatékonyság vizsgálata.....	21
4.5. Statisztikai módszer.....	22
5. Eredmények.....	23
5.1. A <i>Staphylococcus</i> spp. MIC és MEC eredményei.....	23
5.2. Az <i>Enterococcus</i> spp. MIC és MEC eredményei.....	24
5.3. Az <i>Escherichia coli</i> és a <i>Salmonella enterica</i> MIC eredményei.....	25
5.4. A <i>C. albicans</i> MIC és MEC eredményei.....	25
5.5. A baktériumok és <i>C. albicans</i> eredményeinek statisztikai elemzése.....	26
5.6. A <i>Trichomonas gallinae</i> életképessége és tenyésztése.....	27
5.7. A <i>Trichomonas gallinae</i> kezelés eredményei.....	28
5.8. A <i>Trichomonas gallinae</i> eredményeinek statisztikai elemzése.....	29
6. Következtetések.....	31
7. Összefoglalás.....	33
8. Summary.....	34
9. Irodalomjegyzék.....	35
10. Köszönetnyilvánítás.....	41

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CFU	Telepformáló egység ( <i>Colony Forming Unit</i> )
CPLM	<i>Cystein-pepton-liver-maltose</i>
DCM	Diklórmetán
DMSO	Dimetil-szulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. columbae</i>	<i>Enterococcus columbae</i>
<i>E. cecorum</i>	<i>Enterococcus cecorum</i>
<i>E. gallinarum</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>
MEC	Minimális eradikációs koncentráció ( <i>Minimum Eradication Concentration</i> )
MIC	Minimális gátló koncentráció ( <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> )
MRSA	Meticillin-rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i>
PCR	Polimeráz-lánreakció ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
ROS	Reaktív oxigén vegyületek ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SFE	Szuperkritikus folyadék extrakció ( <i>Supercritical Fluid Extraction</i> )
TSA	Trypton-szója agar ( <i>Trypton Soy Agar</i> )
TSB	Trypton-szója leves ( <i>Trypton Soy Broth</i> )

## 1. BEVEZETÉS

Az antimikrobiális rezisztencia terjedése napjaink egyik legégetőbb közegészségügyi problémája. A rezisztencia terjedése a nem megfelelő, indokolatlan és túlzott antibiotikum használatnak a következménye. Antibiotikum alternatívák használatával jelentősen csökkenteni lehetne az antibiotikum felhasználást, ezáltal közvetve a rezisztencia kialakulását és terjedését. Ilyen potenciális alternatív megoldásként szolgálhatnak különböző természetes vegyületek, mint a propolisz.

A propolisz a méhek által termelt gyantaszerű, ragacsos, természetes vegyület. Legfőbb tulajdonságai közé tartozik az antibakteriális, gombaellenes és parazitaellenes hatás. Különböző területekről származó propolisz eltérő antimikrobiális hatékonysággal rendelkezik, amely egyrészt az eltérő összetételnek, másrészt pedig az összetevők közötti interakcióknak köszönhető. Ezen szinergista hatások megfigyelhetőek az egyes propolisz alkotóelemek és bizonyos antibiotikumok között is.

A magyarországi húsgalambok száma megközelítőleg 180 000 db, ezenfelül több ezer posta-, és díszgalamb tenyésztő is gyarapítja a hazai galamblétszámot. Magyarországon egyetlen galambokra engedélyezett antibiotikum van, a ronidazol, a rezisztencia ennek ellenére mégis számos galambokból izolált kórokozó esetén kimutatható más antibiotikumra nézve. Több szakirodalom szerint a haszonállatok közül a húsgalambok az egyik legjelentősebb rezervoárjai az antibiotikum rezisztens baktériumtörzseknek. Ezenfelül a postagalambok a versenyeztetés során több száz kilométert megtéve jelentősen hozzájárulnak a rezisztens törzsek terjesztéséhez.

Kutatásunk célja volt, hogy meghatározzuk egy észak-alföldi eredetű propolisz, mint potenciális antimikrobiális szer, *in vitro* hatékonyságát galambokból izolált kórokozók esetén. A kutatás során *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella enterica* (*S. enterica*) baktériumok, *Candida albicans* (*C. albicans*) élesztőgomba és *Trichomonas gallinae* protozoa fajok 8-8 törzsét vizsgáltuk a propolisz öt különböző etanolos kivonata (96%, 90%, 80%, 70%, 60%) esetén. Magyarországi eredetű propolisz hatékonyságát galambokból izolált kórokozók esetén idáig nem vizsgálták, ezen kívül *Trichomonas gallinae* esetén az etanolos propolisz tinktúrák hatékonyságát is elsőként vizsgáltuk.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A propoliszról általában

A propolisz egy gyantaszzerű, ragacsos termék, amely különböző növényi részekből, és a méhek (*Apis* spp.) által termelt anyagokból áll [1–5]. Különböző növényekből a méhek gyantát, pollent, valamint rügyekből nedveket gyűjtenek [4, 6], amelyeket gyantaszzerű anyagként a kaptárba szállítanak [6]. Ezután nyál enzimeik segítségével bizonyos anyagokat hidrolizálnak a gyantában, majd méhviasszal keverik össze az elegyet [1].

A propolisz feladata a kaptár védelme. A méhek propoliszsal töltik ki a kaptár falában található hiányosságokat, repedéseket, hidegben szűkítik annak bejáratát. Ezenfelül a méhek ezzel védekeznek a kórokozók ellen is, mumifikálják a betolakodókat megakadályozva a tetem bomlását [2, 4, 6, 7]. A nyers propolisz nem alkalmas kezelésre, vagy vizsgálatra [7], ugyanis kevésbé hatékony a kórokozókkal szemben, mint a propolisz kivonat [8]. Először az aktív hatóanyagokat kell feloldani és kivonni. Erre alkalmas oldószerek az etanol, a metanol, a víz, a hexán, az aceton, a kloroform, a diklórometán (DCM) és a dimetil-szulfoxid (DMSO). Ezen felül a szuperkritikus folyadék extrakciót (SFE) is alkalmazzák az aktív hatóanyagok kivonására [7]. Ez utóbbi során szuperkritikus állapotban (speciális halmazállapot a gáz és folyadék között) lévő CO<sub>2</sub>-ot áramoltatnak át az anyagon, amely kivonja az aktív hatóanyagokat [9].

Az oldószerek nagyban meghatározzák a propolisz biológiai aktivitását. Három brazil propolisz etanolos, valamint SFE kivonatának alkalmazása eltérő minimális gátló koncentráció (MIC) értékeket mutatott *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) és *E. coli* esetén, jól láthatóak az egyes propolisz fajták hatékonysága (**1. táblázat**) közötti különbségek is [10].

1. táblázat Brazil propolisz etanolos és SFE kivonatának eltérő hatékonysága

Minta	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
	MIC (µg/ml)	
Barna propolisz (etanol)	400-800	800-1600
Barna propolisz (SFE)	800-1600	1600
Zöld propolisz (etanol)	200-400	400-1600
Zöld propolisz (SFE)	400-800	1600
Vörös propolisz (etanol)	200	400
Vörös propolisz (SFE)	400	800

Veiga és mtsai. kísérletében a propolisz fő fenolos, antibakteriális hatású komponense az 3,5 diprenil p-kumarinsav, vagy más néven artepillin C, mely etanolos kivonatokban magasabb koncentrációban figyelhető meg, mint hexános kivonatokban [11]. Iráni propoliszok vizsgálata során a fenolos összetevők nagyobb arányban voltak jelen az alkoholos kivonatokban, mint a DCM-es kivonatokban, a flavonoidok mennyisége azonban a DCM-es kivonatokban volt a magasabb [12]. *E. coli* esetében a legalacsonyabb MIC értéket a metanolos kivonat mutatta (303 µg/ml), míg a legmagasabb a propolisz DMSO kivonata esetén volt (3648 µg/ml). *S. aureus* esetén a legalacsonyabb MIC értéket a hexános kivonatok esetén találták (258 µg/ml), míg a legmagasabbakat (930 µg/ml) itt is a DMSO kivonatok mutatták [7].

Jelenleg a propolisznak több, mint 300 ismert komponense van. A propolisz összetétele megközelítőleg: 50% gyanta, 30% viasz, 10% esszenciális olaj, 5% pollen és további 5% egyéb szerves komponens [1, 5, 7, 13, 14]. A propolisz egy komplex elegy, amelynek pontos összetétele függ az adott földrajzi területtől [15], annak flórájától [1, 5, 6], az éghajlati viszonyoktól [16], az év adott időszakától [1, 5], a méhek genetikai adottságaitól [1, 7], és az oldószer minőségétől is [17].

Bueno-Silva és mtsai. kísérletükben igazolták, hogy a brazil vörös propolisz esetében szezonális különbségek figyelhetők meg kémiai összetétel és antibakteriális aktivitás tekintetében. A vesztitol, neovesztitol és izolikviritigenin, mint fontos antibakteriális anyagok koncentrációja az esős évszak (január-május) során volt a legmagasabb a vizsgált mintákban. Továbbá az esős évszakban gyűjtött brazil vörös propolisz hatékonyabbnak bizonyult a protozoák elleni kezelés során is [18]. A fő, biológiailag aktív kémiai komponensek a polifenolok és a terpenoidok [7, 12]. A polifenolok felelősek a legtöbb farmakológiai hatásért [16]. Azonban fontos, hogy az egyes hatóanyagok közötti interakciókat is figyelembe vegyünk, ne csak egy-egy molekula önálló hatását [1]. Például a pinocembrin, galangin és krizin együttesen magasabb antibakteriális aktivitást mutat, mint külön-külön *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* és *Pseudomonas aeruginosa* esetén [14]. A polifenolok közé soroljuk a flavonoidokat, fenol savakat, és észtereket [16], a flavonoidok esetén a molekulák B-gyűrűje felelős a biológiai hatásért [5]. A flavonoidok közé tartozó fontosabb biológiailag aktív vegyületek: krizin, tektokrizin, pinocembrin, apigenin, galangin, kempferol, kvercetin és a pinosztrobin. A fenol savak közé soroljuk a következő aromás vegyületeket: koffeinsav, fahéjsav, p-kumarinsav, benzoésav, szalicilsav, ferulasav.

További kiemelten fontos fenolos összetevő az artemillin C. A terpenoidok közé soroljuk a terpineolt, kámfort, geraniolt, nerolt és farnezolt [7].

A propolisz rendkívüli diverzitása, és szinergista hatása antimikrobiális szerekkel, nagyon fontos tényező a mikrobiális rezisztencia csökkentésében, és kialakulásának megelőzésében. Írországból származó propolisz szinergista hatást és fokozott hatékonyságot mutatott vankomicinnel, és oxacillinnel meticillin-rezisztens *S. aureus* (MRSA) baktériummal szemben [14]. Egy olasz eredetű propolisz ampicillin, gentamicin, klóramfenikol, vankomicin és sztreptomycin antibiotikumok antibakteriális hatását fokozta *S. aureus*, és *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) esetén [19]. Ampicillinre, ceftriaxonra és doxiciklinre rezisztens *S. aureus* érzékennyé vált propoliszsal kombinált kezelés hatására [20]. A ceftazidim és apigenin együttes hatása sejtmembrán károsodást, és sejthalált okozott a ceftazidim rezisztens *Enterobacter cloacae* esetén [5]. A kvercetin csökkenteni képes a rezisztenciát a béta-laktám antibiotikumokra, amit egy penicillin rezisztens *S. aureus* törzs esetén írtak le [5]. Al-Waili és mtsai. megfigyelték a propolisz fokozott antibakteriális aktivitását *S. aureus* és *E. coli* esetében, ha mézzel kombinálták [8]. A gombaellenes nisztatin hatóanyaggal is szinergizmust figyeltek meg *C. albicans* esetén [20], lengyel eredetű propolisz pedig szubinhibitorikus koncentrációban szinergista hatást mutatott flukonazollal és vorikonazollal [21].

Minden propolisz közös tulajdonsága az antibakteriális [1–3, 5, 22], antivirális, antioxidáns, antiproliferatív, gombaellenes [3, 7, 22], parazitaellenes, gyulladáscsökkentő [6, 7], antiprotozoás [23], immunmoduláns [2, 22], hepatoprotektív [1], daganatellenes, citotoxikus és sebgyógyulást segítő hatás [6], amelyet számos biológiailag aktív molekulájának köszönhet [1]. Kutatásunk során galambokból izolált patogén baktériumok, *C. albicans* és *Trichomonas gallinae* propolisz érzékenységét vizsgáltuk. Jelenleg Magyarországon megközelítőleg 180 000 db húsgalambot tartanak ezenfelül több ezer posta-, és díszgalamb tenyésztő is növeli a hazai galamblétszámot [24]. Számos országban megfigyelték, hogy a gazdasági haszonállatok közül a galambok az egyik legjelentősebb rezervoárjai az antibiotikum rezisztens baktériumtörzseknek. A rezisztencia terjedésében kiemelt szerepet kapnak a postagalambok, hiszen egy-egy verseny alkalmával több száz kilométert tesznek meg, lehetőséget adva a rezisztens baktériumok terjedésének [25, 26].



## 2.2. A propolisz antibakteriális hatása

A propolisz antibakteriális hatékonysága az esetek többségében Gram-pozitív baktériumok ellen kifejezettebb, mint a Gram-negatív baktériumokkal szemben [7, 27–29]. Ez két dolognak köszönhető: egyrészt a Gram-negatív baktériumok jellegzetes sejtfa nagyobb védelmet jelent a baktérium számára [7], másrészt a sejt külső membránjának fehérje jellegű, hidrolitikus enzimeit inaktiválják a propolisz aktív összetevőit [5, 28]. Przybyłek és Karpiński kísérletében a *S. aureus* és az *E. coli* MIC értékeinek vizsgálata jól tükrözi, hogy a propolisz etanolos kivonatának *S. aureus* törzsekkel szembeni legalacsonyabb MIC értéke 8-80 µg/ml, míg a legmagasabb MIC értéke 750-1445 µg/ml közöttiek voltak. Ezzel szemben az *E. coli* törzseknél 116-510 µg/ml, valamint 1200-5000 µg/ml közötti értékeket figyeltek meg [7]. Azonban Nina és mtsai. a bolíviai propoliszt hatékonyabbnak találták a Gram-negatív baktériumok ellen, mint *S. aureus* ellen [30].

Az antibakteriális hatások közé tartozik a nukleinsav szintézis gátlása, a motilitás csökkentése [28], a sejtmembrán funkcionális károsítása, az energia metabolizmus gátlása [5, 31], a biofilm képződés gátlása [14, 22], a sejtmembrán fehérjéinek károsítása, a membrán permeabilitás megváltoztatása [28, 31] és a bakteriális rezisztencia csökkentése [5]. A flavonoidok, mint a propolisz legjelentősebb fenolos összetevői jellemzően a nukleinsav szintézist gátolják a baktériumokban, legfőképpen a topoizomeráz II-hoz való kötődésen keresztül. A kvercetin a baktériumok adenzin-trifoszfátáz enzimét gátolja azáltal, hogy a DNS-giráz B alegységéhez köt [5]. A propolisz képes egy vízréteget képezni saját felszínén (*exclusion zone*), amely fizikailag távol tartja a kisebb molekulákat, ionokat, kolloidokat, valamint mikrobákat is. Ezen fizikai barrier áll a háttérben számos antibakteriális hatásmechanizmusának, hiszen ezt a számos összetevőjében található hidrofil csoportoknak (-OH, -COOH) köszönhetően tudja kialakítani [13]. Rivera-Yañez és mtsai. kísérletében maláj propolisz, valamint ennek nanorészecskéi gátolták *S. epidermidis* biofilmképződését [14]. A pinocembrin, apigenin, kvercetin és az artepillin C antibakteriális hatása jelentős. A fahéjsav és származékainak számos baktérium ellen kimutatták hatását, amelyeket a sejtmembrán károsításával, adenzin-trifoszfátáz gátlásával, valamint a sejtosztódás és biofilmképződés gátlásával ért el [7].

### 2.2.1. A propolisz *Staphylococcus* spp. ellenes hatékonysága

A *Staphylococcus* nemzetség tagjai Gram-pozitív baktériumok, amelyek igen széleskörű megbetegedéseket tudnak okozni. Kezelésük egyre komplikáltabb, ugyanis egyre szélesebb körű az antibiotikum rezisztens törzsek spektruma a helytelen antibiotikum

használat következtében. A *S. aureus* óriási közegészségügyi jelentőséggel bíró tagja a nemzetségnek, ugyanis az MRSA napjaink egyik legégetőbb nozokomiális fertőzéseket okozó kórokozója [32]. Baromfi esetén szisztémás fertőzést, valamint lokálisan bőr-, és sebfertőzéseket, légúti megbetegedéseket, artritist tudnak okozni [33, 34].

2. táblázat A propolisz *S. aureus* ellenes hatékonysága országoként

Eredet és a vizsgált propolisz minták száma	Törzsek száma	Etanolos kivonat%	MIC µg/ml	Forrás
Szerbia	66	4	95%*	78-16 100 [27] [35]
Görögország	1	1	70%	120 [36]
Brazília	27	27	54%, 80%, 95%, 100%	6,25-4000 [37] [38] [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [10]
Tajvan	1	1	60%, 99,5%	10-20 [47]
Nagy-Britannia	1	1	70%, 100%	80-500 [48] [49]
Ausztria	1	1	70%	2400 [50]
Franciaország	1	1	70%	4600 [50]
Németország	2	2	70%	1200-1400 [49] [50]
Chile	25	3	70%*	62,5-26 900 [51] [52]
Omán	8	1	70%	42-169 [53]
Marokkó	47	6	70%	2-1250 [54] [55] [56]
Szlovénia	1	1	70%, 96%	150-340 [57]
Irán	2	2	80%	150-250 [58] [59]
Szaúd-Arábia	1	1	70%	1500 [60]
Egyiptom	1	1	70%	1500 [60]
Dél-Afrika	39	1	100%	6-1563 [44]
Ausztrália	2	1	100%*	400-2000 [61]
Csehország	1	1	70%	300-600 [49]
Lengyelország	7	33	70%	128-780 [62] [63]
Palesztina	2	1	70%	170-1250 [56]
Kuba	20	1	100%*	4,4-58,2 [64]
Bolívia	10	2	100%*	125-1000 [65]

\* Metanolos kivonat

A **2. táblázat** összefoglalja a különböző országokból származó propoliszok alkoholos kivonatának *S. aureus* kórokozóval szembeni vizsgálatok során mért MIC értékeit. Az alkoholos kivonatok alkalmazása során kapott MIC értékek igen széles határok között mozognak, amely jól tükrözi a propolisz rendkívüli diverzitását. A legtöbb esetben a propolisz igen hatékonynak bizonyult. Rendkívül hatékony értékeket Marokkóból, Kubából és Dél-Afrikából származó propoliszok esetén találtak 2 µg/ml [55], 4,4 µg/ml [64] és 6 µg/ml [44] koncentrációban. Görögországi 70 %-os propolisz tinktúra MIC értéke 120 µg/ml volt [36]. Tajvanból származó propolisz igen alacsony 10-20 µg/ml koncentrációban már hatékonynak bizonyult [47]. Ománi eredetű etanolos kivonat szintén hatékony volt 42 µg/ml és 169 µg/ml közötti MIC értékkel [53]. Azonban bizonyos esetekben a propolisz kevésbé volt hatékony *S. aureus* ellen, Szaúd-Arábiából és Egyiptomból származó propolisz csupán 1500 µg/ml MIC értéket mutatott [60]. Osztrák és francia eredetű propolisz pedig 2400 és 4600 µg/ml koncentrációban volt csak hatékony [50]. Szerb propolisz esetén megfigyeltek 16 100 µg/ml-es MIC értéket is [35].

### **2.2.2. A propolisz *Enterococcus* spp. ellenes hatékonysága**

Az *Enterococcus* nemzetség tagjai a gyomor-, bélcsatorna mikrobiomjának természetes részét képezik, tehát fiziológiás esetben is jelen vannak a gasztrointesztinális traktusban. Gram-pozitív, gömb alakú baktériumok, amelyek egyesével, párosan vagy rövid láncokat alkotva helyezkednek el. A legnagyobb jelentőségű, és a legtöbb esetben fertőzést okozó fajok az *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), az *Enterococcus faecium*, az *Enterococcus cecorum* (*E. cecorum*), az *Enterococcus avium*, az *Enterococcus columbae* (*E. columbae*) és az *Enterococcus gallinarum* (*E. gallinarum*). Gyakran okoznak nozokomiális fertőzéseket, többek között húgyúti fertőzések, endokarditisz és bakterémia kialakulásáért felelősek [66, 67].

A **3. táblázat** összefoglalja a különböző országokból származó propoliszok alkoholos kivonatának *E. faecalis* vizsgálatai során mért MIC értékeket. A MIC értékek 31,3 [46] és 16 800 [35] µg/ml között változnak, azonban az esetek többségében a propolisz hatékony az *E. faecalis* esetén. A legalacsonyabb MIC értékeket a 7 országban történt vizsgálatok közül Brazília, Dél-Afrika és Marokkó esetében írták le 31,3 µg/ml [46]; 49 µg/ml [44] és 70 µg/ml [55] koncentrációban. Továbbá palesztin és iráni eredetű propolisz mérsékelten volt hatékony, 170-625 µg/ml [56] és 250-300 µg/ml [58, 59] közötti MIC-értékekkel. Szlovénia esetén az átlagos értékekhez képest magasabb MIC értékeket (1200-1400 µg/ml) írtak le [57].

**3. táblázat** A propolisz *E. faecalis* ellenes hatékonysága bizonyos országokban

Eredet és a vizsgált propolisz minták száma	Törzsek száma	Etanolos kivonat%	MIC µg/ml	Forrás
<b>Szerbia</b>	66	2	95%*	300-16 800 [27] [35]
<b>Brazília</b>	14	8	80%, 95%, 100%	31,3-1600 [41] [42] [43] [44] [46]
<b>Szlovénia</b>	2	1	70%, 96%	1200-1400 [57]
<b>Irán</b>	2	2	80%	250-300 [58] [59]
<b>Dél-Afrika</b>	39	1	100%	49-1563 [44]
<b>Marokkó</b>	23	1	70%	70-1120 [55] [56]
<b>Palesztina</b>	2	1	70%	170-625 [56]

\* Metanolos kivonat

### 2.2.3. A propolisz *E. coli* ellenes hatékonysága

Az *E. coli* Gram-negatív, pálcá alakú, fakultatív anaerob baktérium, a normál bélflóra tagja. A legtöbb *E. coli* törzs, mint a mikrobiom tagja, ártalmatlan az élő szervezet számára, azonban léteznek patogén törzsek is [68]. Ezen törzsek kiemelkedő jelentőséggel bírnak az ételmérgezéssel járó kórképek kialakulásában, azonban okozhatnak húgyúti fertőzéseket, szepszist, és egyéb szisztémás megbetegedéseket is [69].

A **4. táblázat** összefoglalja a különböző országokból származó propoliszok alkoholos kivonatának *E. coli* vizsgálatait során mért MIC értékeket. A MIC értékek itt is tág határok között változnak, azonban ahogyan az előzőekben leírtuk [7, 27–29], Gram-negatív baktérium lévén átlagosan jóval magasabb MIC értékeket találtak, mint Gram-pozitív baktériumok esetében. A leghatékonyabb koncentrációt a bolíviai propolisz abszolút alkoholban történő kivonata esetén találták 31,2 µg/ml koncentrációban [65], Chilében hasonlóan oldott propolisznál 31,5 µg/ml [52], brazil propolisz etanolos kivonata során 128 µg/ml [39] és omán propolisznál 169 µg/ml [53] MIC értékeket írtak le. A legkevésbé hatékony koncentrációkat szerb eredetű kivonat (10 000 µg/ml) esetén [27], valamint brazil eredetű propolisz kivonat (8000 µg/ml) esetén írták le [37].

4. táblázat A propolisz *E. coli* ellenes hatékonysága egyes országokban

Eredet és a vizsgált propolisz minták száma	Törzsek száma	Etanolos kivont%	MIC µg/ml	Forrás
<b>Szerbia</b>	13	1	95%	2500-10 000 [27]
<b>Görögország</b>	1	1	70%	400 [36]
<b>Brazília</b>	16	10	54%, 80%, 95%, 100%	128-8000 [37] [39] [41] [44] [46] [10]
<b>Tajvan</b>	1	1	60%, 70%, 80%, 95%, 99,5%	>640 [47]
<b>Ausztria</b>	1	1	70%	1600 [50]
<b>Franciaország</b>	2	8	70%	128-3400 [50] [70]
<b>Németország</b>	1	1	70%	1200-5000 [49] [50]
<b>Egyesült Királyság</b>	1	1	70%	600-1200 [49]
<b>Omán</b>	8	1	70%	169-356 [53]
<b>Bulgária</b>	1	1	70%	>1000 [53]
<b>Szlovénia</b>	2	2	70%, 96%	290-680 [57]
<b>Szaúd-Arábia</b>	1	1	70%	1500 [60]
<b>Egyiptom</b>	1	1	70%	2500 [60]
<b>Dél-Afrika</b>	39	1	100%	391-1563 [44]
<b>Csehország</b>	1	2	70%	600 [49]
<b>Lengyelország</b>	20	1	70%	>4096 [63]
<b>Chile</b>	19	4	100%*	31,5-1000 [52]
<b>Marokkó</b>	23	4	70%	310-5000 [55] [56]
<b>Palesztina</b>	2	3	70%	310-2500 [56]
<b>Kuba</b>	20	1	100%*	>64 [64]
<b>Bolívia</b>	10	4	100%*	31,2-1000 [65]

\* Metanolos kivonat

#### 2.2.4. A propolisz *S. enterica* ellenes hatékonysága

A *S. enterica* Gram-negatív, pálcá alakú baktérium, amelynek több mint 2500 szerotípusa létezik, okozhatnak enterális, és szisztémás megbetegedéseket egyaránt. Madarak esetén kiemelendő a galambok szalmonellózisát is okozó madár paratífusz.

Galambok esetén a jellemző tünetek: hasmenés, gyengeség, idegrendszeri tünetek, szeptikémia és a szárnyizület gyulladása következtében kialakuló szárnylógatás. Kezelése antibiotikummal, megelőzése vakcinával lehetséges [71].

Az **5. táblázat** összefoglalja a különböző országokból származó propoliszok alkoholos kivonatának *S. enterica* vizsgálatai során mért MIC értékeket. *S. enterica* vizsgálata során hatékonyságban ígéretesnek bizonyuló MIC értékeket írtak le chilei propolisz kivonat esetében 62,5 µg/ml [52] és bolíviai kivonat esetén 125 µg/ml [65] koncentrációban. Azonban a legtöbb esetben az alkoholos propolisz tinktúra nem bizonyult hatékonynak, szerbiai propolisz tinktúra esetén csupán 10 000 mg/ml koncentráció gátolta a növekedést [27]. A szlovéniai eredetű propolisz vizsgálata során a legalacsonyabb MIC érték 580 µg/ml volt, de többségében itt is 1200-1400 µg/ml értékeket írtak le [57].

**5. táblázat** A propolisz *S. enterica* ellenes hatékonysága bizonyos országokban

Eredet és a vizsgált propolisz minták száma	Törzsek száma	Etanolos kivonat%	MIC µg/ml	Forrás	
<b>Szerbia</b>	13	1	95%	10 000	[27]
<b>Szlovénia</b>	1	2	70%, 96%	580-680 1200-1400	[57]
<b>Chile</b>	19	1	100%*	62,5-1000	[52]
<b>Bolívia</b>	10	1	100%*	125-1000	[65]

\* Metanolos kivonat

### 2.3. A propolisz gombaellenes hatása

A propolisz gombaellenes hatása komplex összetételének köszönhetően számos módon érvényesül. Fő hatásmechanizmusa a membránpolarizáción keresztüli sejtmembrán károsítás, és az apoptózis indukciója [21, 28]. Ezenfelül számos gén expresszióját gátolja, amelyek szerepet játszanak a patogenitásban, a sejt adhézióban, a biofilm képzésben és a fenotípus váltásban [21, 28]. A fenotípus váltás, azaz a hifaképződés a gombák egyik legjelentősebb virulencia faktora [21]. A foszforilált adenzin nukleotidok szintjét is csökkenti, ezáltal károsítja a nukleinsav szintézist és az energia metabolizmust [28]. Az antifungális hatásért leginkább a flavonok, és a flavonolok a felelősek. A flavonok fontos képviselője a formononetin igen hatékonynak bizonyult számos gombafaj ellen [21].

A *C. albicans* a nemzetségen belül a leggyakrabban megbetegedést okozó faj. Alapvetően élesztő-típusú gomba, azonban polimorf tulajdonságának köszönhetően három

különböző alakját különítjük el: képes nőni élesztő-, pszeudohifa-, és hifa-típusú formában is. Patogenitás szempontjából a hifa-típusú növekedés a jelentős, ugyanis a gomba ebben a formában képes áthatolni az epitéliumon és endotéliumon, szövetkárosodást okozva [72]. Opportunista patogén, a normál gasztrointesztinális és urogenitális flóra tagja, csak immunszupresszált egyedekben okoz tüneteket [73, 74]. Leggyakrabban a szájüreg, a nyelöcső és a vagina nyálkahártyáján, és a bőrön jelentkeznek fehér lerakódások, de súlyosabb esetben szisztémás fertőzést is tud okozni [74].

6. táblázat A propolisz *C. albicans* ellenes hatékonysága egyes országokban

Eredet és a vizsgált propolisz minták száma	Törzsek száma	Etanolos kivonat	MIC µg/ml	Referencia
<b>Szerbia</b>	13	3	95%	625-5000 [27]
<b>Görögország</b>	1	1	70%	370-1560 [36]
<b>Brazília</b>	16	33	70%, 80% 96%, 100%	98-9250 [38] [43] [44] [46] [75] [76] [77]
<b>Nagy-Britannia</b>	2	3	70% 100%	300-1000 [48] [49]
<b>Ausztria</b>	1	1	70%	1200 [50]
<b>Franciaország</b>	1	1	70% 95%	31,25-1512 [50] [78]
<b>Németország</b>	2	3	70%	4048-5000 [49] [50]
<b>Szlovénia</b>	1	1	70% 96%	460-530 [57]
<b>Szaúd-Arábia</b>	1	1	70%	2000 [60]
<b>Egyiptom</b>	1	1	70%	2500 [60]
<b>Dél-Afrika</b>	39	1	100%	98-3125 [44]
<b>Csehország</b>	1	2	70%	600-1200 [49]
<b>Kuba</b>	20	1	100%*	61,6-64 [64]
<b>Portugália</b>	2	1	80%	11-14,5 [79]
<b>Lengyelország</b>	55	2	70%	2000-37 500 [80] [81]

\* Metanolos kivonat

A 6. táblázat összefoglalja a különböző országokból származó propoliszok etanolos kivonatának *C. albicans* vizsgálatai során mért MIC értékeket. 15 különböző országból származó propolisz vizsgálatai során számos esetben hatékonyak bizonyultak a kivonatok.

Portugál propolisz esetén 11 µg/ml és 14,5 µg/ml MIC értékeket találtak [79], továbbá a francia propolisz is hatékonyan bizonyult már 31,25 µg/ml [78] koncentrációtól. Azonban lengyel propolisz kivonat esetén a hatékonyság jóval gyengébb volt a többi vizsgálathoz képest, csupán 2000-37 500 µg/ml koncentrációk esetén találtak hatékonyságot [80, 81].

#### **2.4. A propolisz parazitaellenes hatása**

A propolisz parazitaellenes hatása szintén számos mechanizmuson alapszik. Megzavarja a foszflipid anyagcserét, ami a sejtmembránt alkotó foszfatidil-glicerol, foszfatidil-inozitol szintjének csökkenéséhez vezet [82]. Ezenfelül egy másik flavonoid csoport, a kalconok jelentősen gátolják a paraziták növekedését. A 2,6-dihidroxí, 4-metoxi-kalcon fokozza a sejt-, és mitokondrium membrán szterol tartalmát és összetételét. Ennek következtében megváltozik a membránok struktúrája és fluiditása [83]. A rozmarinsav és az apigenin sejt-lízist, citoplazma kondenzációt és a sejt-mag DNS-ének aggregációját okozza [84]. A reszveratrol a hidrogenoszóma sejtorganelleum károsításán keresztül fejt ki hatását. Ez a sejtszervecske felelős a protozoák energia termeléséért, és a redox egyensúly fenntartásáért. Az apigenin és a koffeinsav növeli a reaktív oxigén vegyületek képződését (ROS), következményesen mitokondriális duzzadást és apoptózist okoz [85]. A kvercetin vaskelátor; a maszlininsav gátolja a parazita felszíni fehérjekomplexének proteáz működését, mely nélkülözhetetlen a gazdasejtbe jutáshoz [86, 87]. A kempferol az aktin és miozin II nehézlánc expresszióját befolyásolja, ami a paraziták megtapadását gátolja [88].

A *Trichomonas gallinae* egy egysejtű parazita, amely számos madárfaj, köztük a házi galamb (*Columba livia domestica*) trichomoniázisát okozza. A sárgás-fehéres plakkszerű lerakódások jellemzően a felső légutakban, és az emésztőtraktus felső szakaszában jelentkeznak, különös tekintettel a garatüregre és a begyre. Súlyosabb esetben a fertőzés deszcendálhat a nyelőcsőre, átjutva a bélfalon megfertőzheti a nagyobb ereket, és a májat is. A fiókáknál, fiatal egyedeknél igen magas a mortalitás, azonban a kifejlett madarak sokszor tünetmentesek, vagy csak a teljesítményükön látszik a fertőzöttség. Jellemzően a madarak ivóvizén, eleségén keresztül terjed, azonban fiókák esetén a begytejjel, valamint umbilikálisan is be tud jutni a parazita a szervezetbe [89] [90].

A **7. táblázat** összefoglalja M. I. és mtsai. eredményeit a propolisz vizes oldatának *Trichomonas gallinae* ellenes hatékonysága tekintetében. A kezdeti parazitaszámhoz viszonyított százalékos értékek vannak feltüntetve a kezelést követő 24 és 48 órát követően



egyre növekvő propoliszkoncentráció mellett. A propolisz vizes kivonata 24 órás kezelést követően 75 mg/ml koncentráció mellett eradikálta 100%-ban a trophozoitákat [90].

**7. táblázat** A propolisz vizes kivonatának *Trichomonas gallinae* ellenes hatékonysága M. I. és mtsai kísérletében

Propolisz koncentráció (mg/ml)	24 óra	48 óra
	% -os parazitaszám csökkenés	
<b>12,5 mg/ml</b>	66,6 %	81,8 %
<b>25 mg/ml</b>	77,7 %	86,4 %
<b>50 mg/ml</b>	88,9 %	100 %
<b>75 mg/ml</b>	100 %	100 %
<b>100 mg/ml</b>	100 %	100 %

*Trichomonas vaginalis* esetén etanolos brazil barna propolisz kivonata 400 µg/ml koncentráció esetén volt hatékony [91]. Sena-Lopes és mtsai. vizsgálatuk során a propolisz etanolos kivonatának 500 µg/ml koncentrációja esetén írták le a trophozoiták 100%-os eradikációját [92]. Az irodalomban leírt egyetlen vizsgálat *Trichomonas gallinae* esetén az egyiptomi eredetű propolisz vizes kivonata, mely esetén a MIC érték 75 000 µg/ml volt [90].

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen kutatás célja, hogy *in vitro* megvizsgáljuk a propolisz antibakteriális, gombaellenes és protozoaellenes hatékonyságát különböző töménységű etanolos kivonatokat alkalmazva, valamint ezen oldatok között megnézzük az esetleges hatékonyságon belüli különbségeket.

A vizsgálat során meghatároztuk egy észak-alföldi régióból származó propolisz etanolos kivonatainak MIC és minimális eradikációs koncentráció (MEC) értékeit Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok, *C. albicans* élesztő és *Trichomonas gallinae* protozoa esetén. Gram-pozitív baktériumok közül *Staphylococcus spp.*, és *Enterococcus spp.*, Gram-negatív baktériumok közül pedig *E. coli* és *S. enterica* törzseket vizsgáltunk. A propolisz öt különböző töménységű etanolos kivonatát alkalmaztuk a vizsgálathoz (96%, 90%, 80%, 70%, 60%). A vizsgálatban minden egyes kórokozó 8-8 törzsét vizsgáltuk az öt különböző töménységű etanolos tinktúra tekintetében. Első hipotézisünk az volt, hogy a propolisz antibakteriális hatékonysága között Gram-pozitív baktériumok és Gram-negatív baktériumok esetén nincs különbség, továbbá hatékonyan gátolja a *C. albicans* és *Trichomonas gallinae* növekedését. Második hipotézisünk pedig az volt, hogy a különböző töménységű etanolos kivonatok között hatékonyságon belüli különbségeket fogunk tapasztalni.

## 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1. A propolisz törzsoldatok és a mikróbák előkészítése

A vizsgálathoz használt nyers propolisz az észak-alföldi régióból származott. A kezeléshez ötféle propolisz törzsoldatot használtunk, mert szakirodalmi források leírták, hogy a különböző alkohol koncentrációkban más-más flavonoidok oldódnak ki nagy mennyiségben, így a 80%-os alkoholban elsősorban kempferid, acacetin és izorhamnetin, a 70%-os alkoholban pinocembrin és szakuranetin, a 60%-os alkoholban pedig izoszakuranetin, kvercetin és kempferol [16]. A vizsgálataink során az egyik hipotézis vizsgálatunk az volt, hogy van különbség a különböző töménységű alkoholos kivonatok hatékonysága között.

A baktériumok és gomba vizsgálatához 96%-os kivonatunk elkészítése esetén 10g propoliszhoz 30 ml alkoholt és 10 ml glicerint adtunk, a többi négy esetben 10-10 g propoliszhoz adtunk 40 ml 60%-os, 70%-os, 80%-os és 90%-os alkoholt. Mind az öt esetben 250 mg/ml propolisz koncentrációval számoltunk. A 96%-os alkoholos kivonat esetén a glicerint használatának az oka, hogy ezt a készítményt használták galambok kezelésére a propolisz származási helyén található telepen, és szeretnénk volna kideríteni, hogy okoz-e a hatékonyságban bármi különbséget. A 96-os mikrotiter lemezen (VWR International, LLC., Magyarország) történő elrendezés úgy történt, hogy az adott propoliszos tinktúrával kezelt minta alatt mindig kontrollként csak az adott oldószer hatását is vizsgáltuk. A lemezek első oszlopába 30 µl táplevest mértünk, majd 150 µl propolisz oldatot adtunk hozzá. Így az első oszlopban minden esetben 208 mg/ml propolisz koncentrációt kapunk.

A baktérium törzseket Budapest és környékéről gyűjtöttük beteg vagy elhullott galambokból vett bakteriológiai mintákból. A több hónapos mintagyűjtést követően a **8. táblázatban** látható fajokat használtuk fel a vizsgálatainkhoz.

Ahol szükség volt rá, a vizsgálandó törzseket a saját fagyasztott törzseinkből egészítettük ki, úgy, hogy minden nemzetségből 8-8 törzs legyen (staphylococcusok esetén 2 törzs, enterococcusok esetén 3 törzs, *E. coli* esetén 1 törzs), illetve *C. albicans* esetén teljes mértékben saját fagyasztott törzsekből dolgoztunk, mivel gombák izolálása nem történt.

Mindegyik törzsből egy sárga kacsnyi telepet oltottunk be 3-3 ml tripton-szója levesbe (TSB), majd 18-24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk őket.

**8. táblázat** A vizsgált mikroba fajok és fajon belül a törzsek száma, forrása

Baktérium faj	Mennyiség	Minta forrása
<i>S. aureus</i>	2 törzs + 2 törzs*	orrüreg és tojás
<i>S. delphini</i>	2 törzs	légutak és máj
<i>S. sciuri</i>	2 törzs	légutak és bélcsatorna
<i>E. gallinarum</i>	1 törzs + 3 törzs*	kötőhártya
<i>E. columbae</i>	2 törzs	légutak és bélcsatorna
<i>E. hirae</i>	1 törzs	légutak
<i>E. cecorum</i>	1 törzs	légutak
<i>E. coli</i>	7 törzs + 1 ATCC törzs*	kötőhártya, bélcsatorna, máj
<i>S. enterica</i>	8 törzs	bélcsatorna, máj, ízület, here
<i>C. albicans</i>	8 törzs*	bőr

\* A Gyógyszertani és Méregtani Tanszék korábban baromfiból izolált és lefagyasztott törzsei, valamint vásárolt ATCC törzs

#### 4.2. A baktérium- és gombaellenes hatékonyság vizsgálata

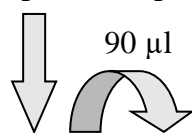
A lemezek első oszlopát kivéve az összes lyukat 90 µl TSB táplevessel töltöttük fel, az első oszlop lyukaiba 30 µl TSB táplevest mértünk (1. lépés). A kész törzsolatokból minden egyes lemez első oszlopának minden második sorának lyukaiba (A, C, E, G) 150 µl-t mérünk be. Azokba az első oszlopon belüli lyukakba, melyekbe nem mértünk be propolisz tinktúrát (B, D, F, H) 150 µl oldószert pipettáztunk, kontrollként az alkohol mikroba ellenes hatásának vizsgálatához. Az első oszlopban így minden esetben 180 µl oldat volt, innen 90 µl oldatot a második oszlopba mértünk, szuszpendáltuk azt 2-3 alkalommal és így tovább (2-3. lépés), majd a 10. oszlopot követően a pipetta hegyet a 90 µl oldattal feleslegben kidobtuk (4. lépés). Így minden oszlopban 90 µl oldat volt, ezzel elkészítve a 2-es alapú hígítási sort (**1. ábra**). Előzetes vizsgálatainak alapján, ahhoz, hogy megtaláljuk a propolisz MIC értékeit, minden lemez hígítását egy második lemezen tovább kellett hígítanunk.

Ezt követően az inokulum (segéd) lemez 240 µl TSB levessel feltöltött oszlopaiba a tömény baktérium szuszpenziókból bemértünk 10 µl-t. A bemérés előtt a baktériumokat tartalmazó csöveket vortexeltük a homogén eloszlás érdekében. Így a kiindulási baktériumok 25x hígítását használtuk a vizsgálatokhoz. A kontroll sorok miatt két egymást követő sorba ugyanaz a baktérium lett beoltva. Az inokulum lemezek elkészítése után az 1. oszlop A-H lyukakból a hígítási sort tartalmazó lemezek 11. (pozitív kontroll) oszlopától kezdve, minden lyukba 10 µl baktérium szuszpenziót mértünk be, minden egyes hígítási sort tartalmazó lemez esetén új oszlopot felhasználva (5. lépés). Így a kész lemezek minden

lyukában 100 µl oldat volt, kivéve a negatív kontroll, ahol ez 90 µl volt (**2. ábra**). Ezután a lemezeket 18-24 h-ig 37 °C-on inkubáltuk, majd elbíráltuk a MIC értékét.

### 1. lépés: feltöltés

### 2. lépés 3. lépés



### 4. lépés 90 µl feleslegben kidob

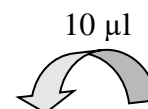


2x 4x 8x 16x 32x 64x 128x 256x 512x 1024x

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
B	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
C	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
D	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
E	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
F	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
G	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
H	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-

1. ábra A lemez táplevessel való feltöltése (1. lépés), a kettes alapú hígítási sor elkészítése (2-3. lépés), végül a felesleg eldobása (4. lépés)

### 5. lépés



2x 4x 8x 16x 32x 64x 128x 256x 512x 1024x

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	+	-
B	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	+	-
C	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	+	-
D	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	+	-
E	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	+	-
F	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	+	-
G	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	+	-
H	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	+	-

2. ábra A baktérium szuszpenzió bemérése a 11. pozitív kontroll oszloptól (5. lépés)

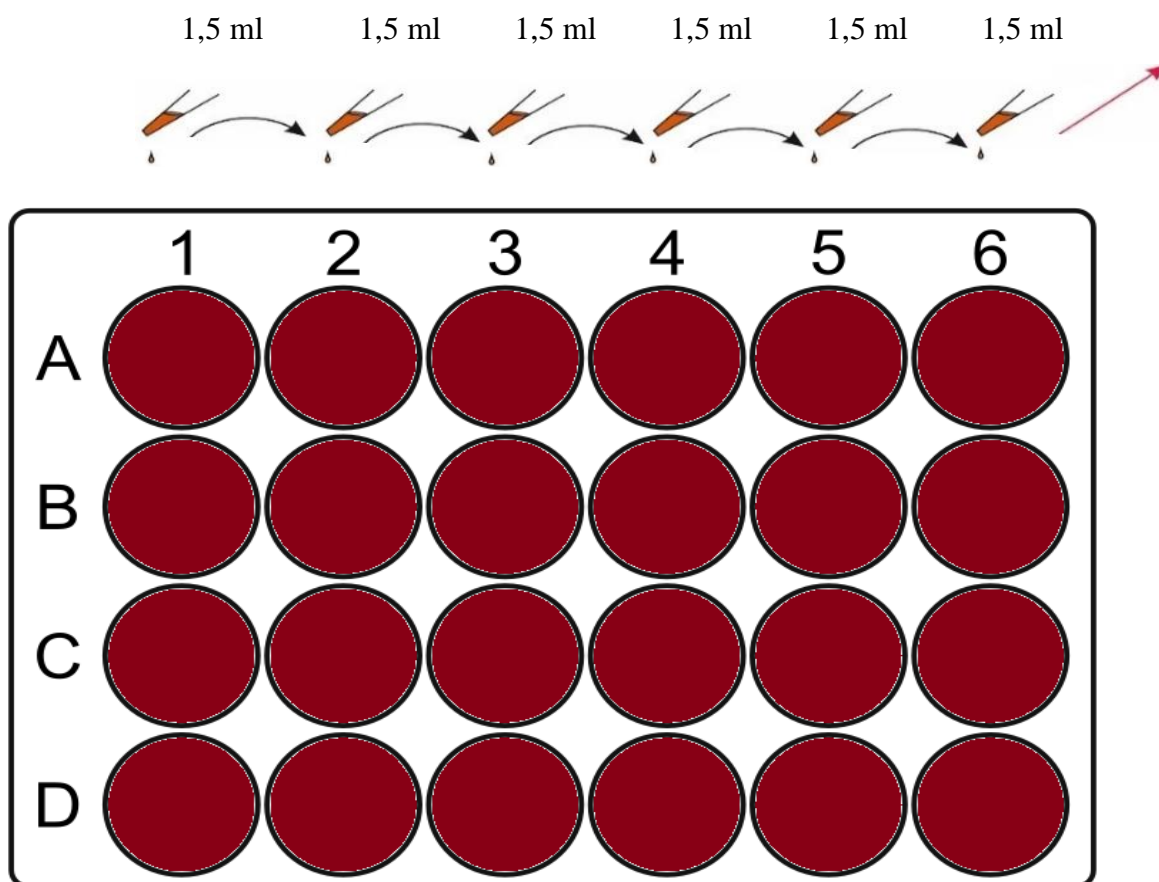
### 4.3. A *Trichomonas gallinae* előkészítése

A *Trichomonas gallinae* minták gyűjtése 2021. tavaszán két budapesti galambállományból történt. A tizenhárom minta közül 7 mintában mikroszkóposan sikerült élő *Trichomonas gallinae* alakokat detektálnunk, melyeket később polymerase chain

reaction (PCR) vizsgálattal is igazoltak. Ezek közül 3 törzset választottunk ki a vizsgálatainkhoz (6., 10. és 11. törzset). A mintagyűjtés 8 ml *Trichomonas* cystein-pepton-liver-maltose (CPLM) medium base, modified táplevesben, a minták szállítása temperált hőmérsékleten történt. Ezt követően 37 °C-os termosztátban inkubáltuk őket. A törzsek fenntartásához és tenyésztéséhez a mintagyűjtéshez is használt speciális táplevest használtunk, amely 425 ml CPLM táplevesből (Biolab Diagnostics Laboratory Inc., Magyarország), 1 fiole *Trichomonas* szelektív kiegészítőből (4 ml steril, ioncserélt vízben feloldva) és 70 ml steril, inaktivált (56 °C-on 30 percig) pH 6-ra beállított lószerűből állt.

#### 4.4. A *Trichomonas gallinae* ellenes hatékonyság vizsgálata

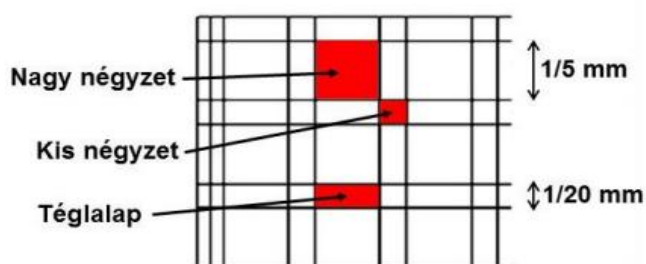
Minden propoliszt tartalmazó hígítási sor alatt egy kontroll sort készítettünk, ahova csak az oldószert mértük be. A vizsgálat 24 lyukú lemezekben (VWR International, LLC., Magyarország) végeztük. A vizsgálatához a törzsolatok és oldószerek mindegyikét 2,5x-ére hígítottuk, ezek lettek a kiindulási törzsolataink, melyekből az első oszlop lyukaiba 0,3 ml-t mértünk be.



3. ábra A 2-es alapú hígítás sor elkészítése

1. lépésként a 24-es lemez első oszlopát 2,7 ml táplevessel töltöttük fel, a többi lyukba 1,5 ml táplevest mértünk. 2. lépésként az első oszlop „A” és „C” lyukaiba bemértünk 0,3 ml propoliszos tinktúrát, majd ezek alá a „B” és a „D” lyukakba a hozzájuk tartozó oldószerből szintén 0,3 ml-t. 3. lépésként 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 1,5 ml szuszpenzióval eldobtuk (**3. ábra**). Így kettes alapú hígítási sort készítettünk, 25x, 50x, 100x, 200x, 400x, 800x hatóanyag hígítással, mindegyik lyukban 1,5 ml szuszpenzióval. 4. lépésként a vizsgált *Trichomonas gallinae* szuszpenzióból 50 µl mennyiséget mértünk minden lyukba. Egy külön lemezen hatóanyag nélküli kontroll hígítási sort készítettünk. Ezt követően a lemezeket 37 °C-os termosztátba helyeztük 18-24 órára, az inkubációt követően Bürker-kamra segítségével meghatározzuk a trophozoiták számát.

A trophozoiták mennyiségi meghatározása (db/ml) Bürker-kamra [93] segítségével történt. A sejtszámoláshoz használt általános képlet alapján a **nagy négyzetekhez** tartozó átlagos sejtszámot vettük (**4. ábra**), az alábbi képlet segítségével: a kezdeti szám meghatározása során 25, a kezelések során 5 nagy négyzetben megszámoltuk a trophozoiták számát, majd átlagoltuk azt, végül megszoroztuk a Bürker-kamrás vizsgálathoz történt hígítás mértékével. 20 µl szuszpenzióhoz adtunk 20 µl steril fiziológiás sóoldatot, tehát kétszeres volt a hígítás és végül szorzófaktorként  $2,5 \times 10^5$ -nel kellett szorozni.



**4. ábra** Bürker-kamrán történő sejtszámláláshoz használt nagy négyzet

#### 4.5. Statisztikai módszer

Az eredmények elemzéséhez az R program 4.0.5 verzióját használtuk. Az eredményeket One-way ANOVA-val vizsgáltuk, minden faj esetén külön-külön. A nullhipotézisünk az volt, hogy a különböző alkohol kivonatok hatékonyságai között nincs különbség. A protozoa vizsgálat során néztük, hogy a minták sejtszáma 24, 48 és 72 óra alatt hogyan változott, kétoldalú vizsgálattal tudtunk arra következtetni, hogy sikeresen szaporodtak vagy szignifikánsan csökkent a mennyiségük a kiindulási sejtszámhoz képest.

## 5. EREDMÉNYEK

A MIC mérés korlátai közé tartozik, hogy a 96-os lemezen végzett vizsgálatok esetén az alkoholos tömény propolisz tinktúra hígítása során a propolisz kicsapódott a lemezben és leülepedett a lyukak aljára. Ezért ilyen formában a lemezen az oldat zavarosodása, tehát annak megítélése, hogy a baktériumok tudtak-e szaporodni vagy sem, nem volt elbírálható. Viszont, ha a felülúszót óvatosan átpipettáztuk egy steril 96-os lemezre, jól láthatóvá vált, hogy mely hígítások esetén van zavarosodás a táplevesben.

Az átpipettázást követően jól látható volt, hogy a kontroll sorok esetén az alkohol mely hígítása gátolta a baktériumok növekedését, ezért a propolisz hatékonyságának megítélése csak azon oszlopoktól kezdve volt lehetséges, melyek alatt a kontroll sorban a kórokozók felszabadultak az alkohol gátlása alól. A módszer ellenőrzéseként az alkohol gátlása alól felszabaduló első három oszlopainak lyukaiból tripton-szója agarra (TSA) oltottunk ki 50-50 µl szuszpenziót, telepformáló egység (CFU) meghatározás céljából. A CFU eredménye a propoliszt tartalmazó lyukak esetén nulla lett, a csak alkoholt tartalmazó lyukak esetén pedig a kórokozók konfluensen benőtték a Petri-csészét. Tehát elmondhatjuk, hogy a kontroll sorok alapján meg tudtuk határozni, hogy melyik hígításig van az alkoholnak hatása és hogy honnan van kizárólag a propoliszból kioldott hatóanyagoknak kifejtett hatása.

A MIC értékek meghatározása mellett a Gram-pozitív baktériumok és a *C. albicans* gomba esetén a MIC lyukaiból, valamint az azt megelőző kettő hígítási oszlop lyukaiból 50-50 µl szuszpenziót TSA agart tartalmazó Petri-csészére kentünk ki, CFU számolás céljából. A célunk a MEC meghatározása volt, tehát azt a koncentrációt kerestük, ami esetén a CFU nulla.

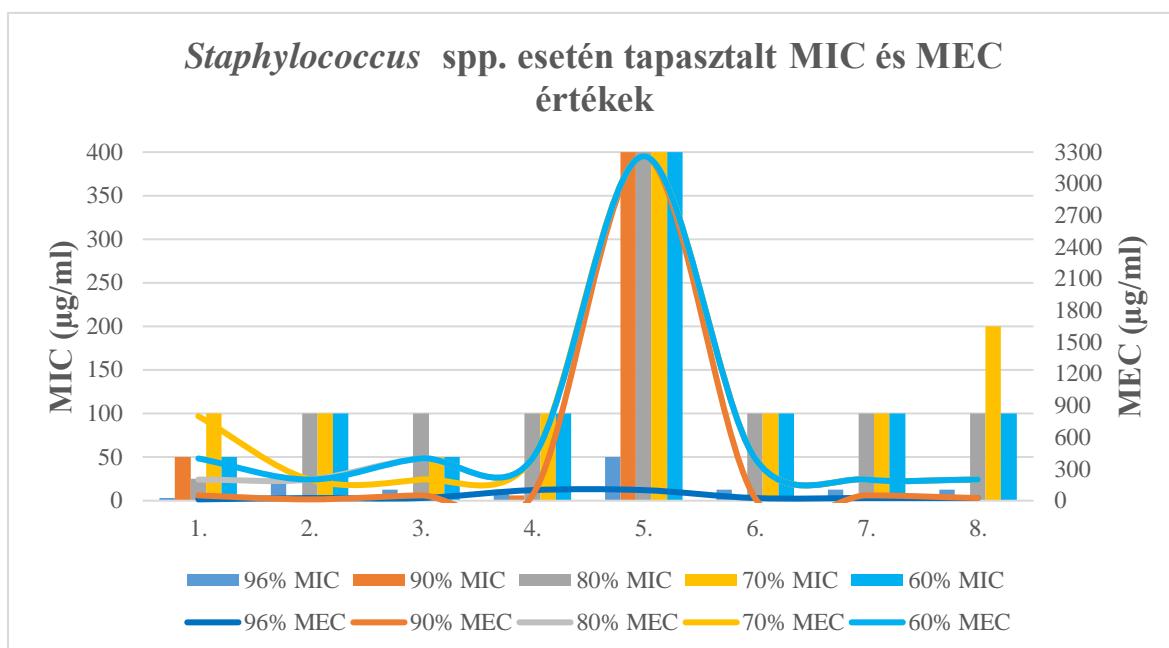
Az alkohol gátlása fajonként eltérő mértékű volt, staphylococcusok esetén jellemzően 6,2-12,5% közötti alkohol koncentrációig gátolt, enterococcusok esetén ez 0,8-12,5% közötti szórást mutatott, míg *C. albicans* esetén jellemzően 1,6-12,5% között volt. *Salmonella* spp. és *E. coli* esetén pedig 2,5-10% között alakult. Ugyanakkor *Trichomonas gallinae* esetén az alkoholnak a vizsgált koncentrációk egyike esetén sem tapasztaltuk befolyásoló hatását.

### 5.1. A *Staphylococcus* spp. MIC és MEC eredményei

A 96%-os kivonat esetén 3,125-50 µg/ml közötti MIC értékeket tapasztaltunk, viszont a MEC értékek ennél magasabbak, 12,5-100 µg/ml között alakultak. A 90%-os kivonat esetén hasonló, 1,5-50 µg/ml közötti MIC értékeket kaptunk – egy kiugró érték volt,



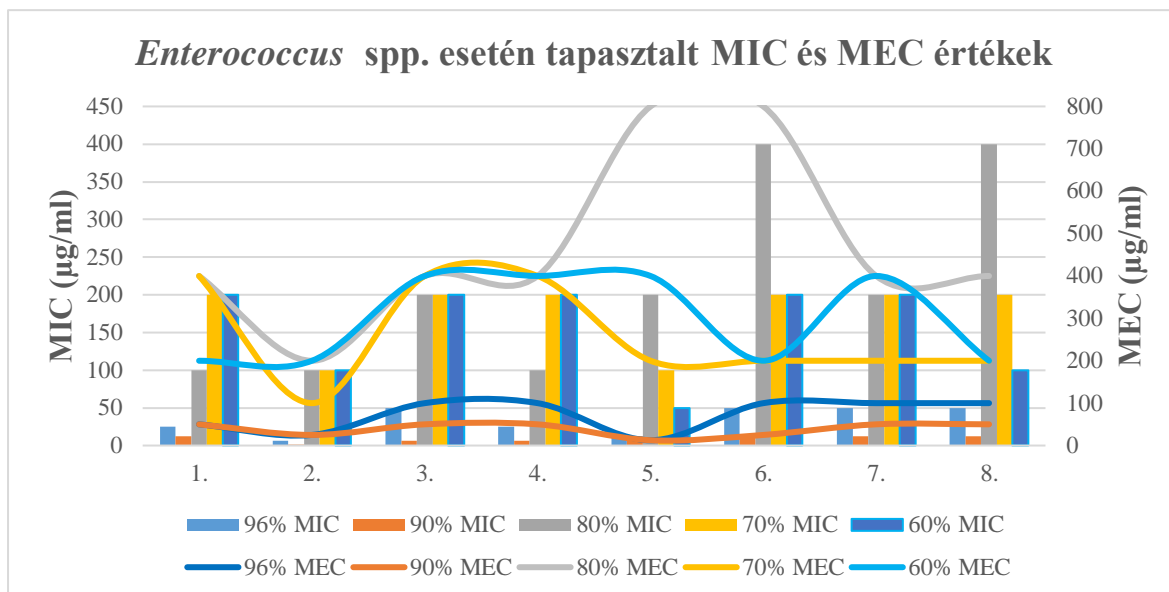
az 5-ös törzs esetén mely 400 µg/ml MIC értéket mutatott, azonban ennek a törzsnek a többi hígítás során is kiugró értékei voltak, ami arra utalhat, hogy rezisztensebb a kezelésekkel szemben. A MEC értékek 12,5-50 µg/ml koncentrációk voltak, kivétel az 5-ös törzs, ahol ez 3260 µg/ml volt. A 80%-os, a 70%-os és a 60%-os kivonatok esetén látható mértékben emelkedett a MIC érték a korábbi kivonatokhoz képest, átlagosan 50-400 µg/ml koncentrációk voltak megfigyelhetők, amivel arányosan a MEC értékek is 200-400 µg/ml közötti koncentrációra nőttek. A kiugró 3260 µg/ml MEC érték továbbra is az 5-ös törzs esetén volt megfigyelhető végig (5. ábra).



**5. ábra** 8 db *Staphylococcus* törzs esetén tapasztalt MIC és MEC értékek a különböző alkoholos propolisz kivonatok esetén (1., 5. *Staphylococcus sciuri*, 2-3. *Staphylococcus delphini*, 4., 6., 7., 8. *S. aureus*). Az egyes törzsek esetén (x-tengely) látható az 5-5 kapott MIC (y-tengely) és MEC érték (z-tengely) azonos színnel feltüntetve.

## 5.2. Az *Enterococcus* spp. MIC és MEC eredményei

A 96%-os kivonat esetén a MIC értékek 6,5-50 µg/ml között alakultak, a MEC értékek pedig 12,5-100 µg/ml között mozogtak. A 90%-os kivonat hasonlóan alakult itt is, a MIC 1,56-12,5 µg/ml volt, a MEC 12,5-50 µg/ml volt. *Enterococcus* fajok esetén jól látható, hogy a 90%-os kivonat hatékonyabbnak bizonyult, mint a 96%-os. A 80%-os, a 70%-os és a 60%-os MIC értékek láthatóan magasabbak (50-400 µg/ml) voltak, valamint a MEC értékek is nagyobbak (100-800 µg/ml) voltak. Az is megfigyelhető, hogy az *E. columbae* törzsek jóval nagyobb érzékenységet mutattak a többi törzshöz képest (6. ábra).



**6. ábra** 8 db *Enterococcus* törzs esetén tapasztalt MIC és MEC értékek a különböző alkoholos propolisz kivonatok esetén (1., 6., 7., 8. *E. gallinarum*, 2., 5. *E. columbae*, 3. *Enterococcus hirae*, 4. *E. cecorum*). Minden egyes törzshöz (x-tengely) azonos színnel hozzá van rendelve a kapott MIC (y-tengely) és MEC érték (z-tengely).

### 5.3. Az *E. coli* és a *S. enterica* MIC eredményei

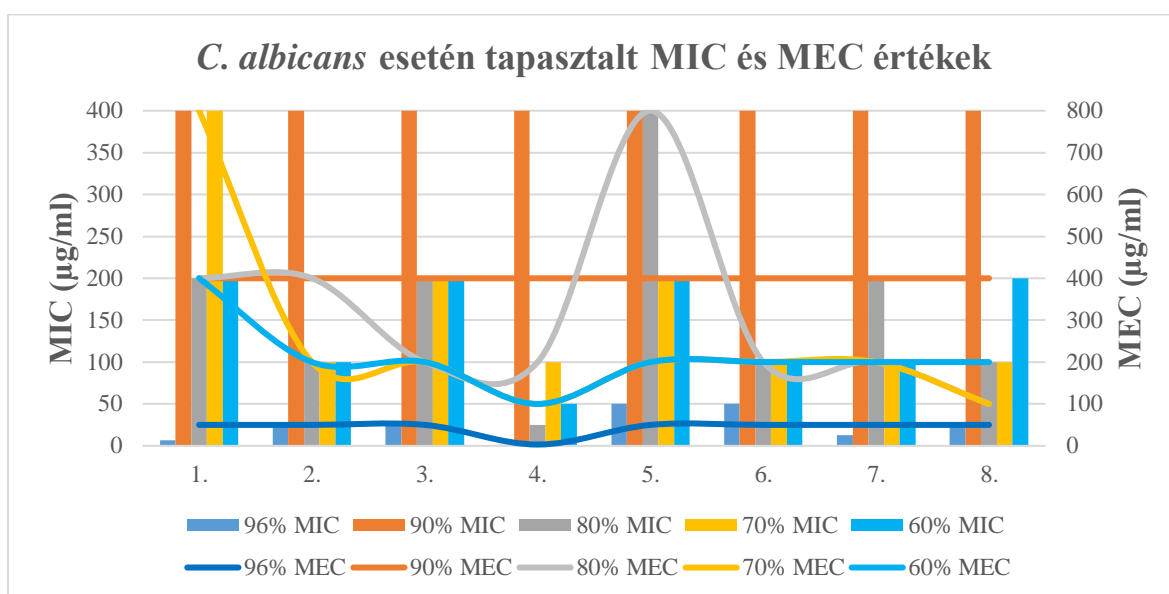
Az *E. coli* törzsek esetén a szakirodalomban leírt különbséget, azaz a Gram-negatív baktériumok esetén tapasztalható jóval kisebb mértékű hatékonyságot találtuk. A MIC érték >13 mg/ml volt, az ennél magasabb koncentrációk az alkohol gátló hatása miatt nem voltak megítélhetők. Egyedül az 5-ös törzsnél gátolta a 13 mg/ml koncentráció a baktériumok növekedését. A többi törzs esetén ezekből az utolsó, már az alkohol gátlása alól felszabaduló oszlopokból Petri-csészére kioltott 50-50 µl minta minden esetben konfluens baktérium növekedést mutatott.

A *S. enterica* törzsek esetén szintén azt tapasztaltuk, hogy a propolisz vizsgálható koncentrációi egyik formájukban sem voltak hatékonyak. Az első, alkohol gátló hatása alól felszabaduló oszlopok 50-50 µl mintáit Petri-csészére kioltva, szintén konfluens növekedés volt tapasztalható. A MIC itt is >13 µg/ml volt.

### 5.4. A *C. albicans* MIC és MEC eredményei

A 96%-os kivonat hatékonysága a baktériumokéhoz hasonlóan alakult, 1,56-50 µg/ml közötti MIC értékeket és 3,125-50 µg/ml közötti MEC értékeket tapasztaltunk. Viszont a 90%-os kivonat esetén itt már a 80%-os, 70%-os és 60%-os kivonatokhoz hasonló jóval kevésbé hatékony eredményeket kaptunk, jellemzően 100-400 µg/ml közötti MIC értékek, valamint 100-800 µg/ml közötti MEC értékek formájában. Egy-egy kiugró érték itt

is előfordult, a 80%-os kivonat 4-es törzs esetén 25 µg/ml, a 60%-os kivonat szintén ennél a törzsnél 50 µg/ml MIC esetén is hatékonynak bizonyult. A 90%-os kivonat esetén azonban egyértelműen (egyöntetűen) sokkal gyengébb hatékonyság látható (400 µg/ml MIC), a többi alkoholos kivonatokhoz képest, ami valószínűleg magyarázható azzal, hogy az irodalomban is leírt eltérő módon kioldódó flavonoid hatóanyagfajták közül a gombák ellen kevésbé hatékony komponensek oldódhattak ki (7. ábra).



**7. ábra** 8 db *C. albicans* törzs esetén tapasztalt MIC és MEC értékek a különböző alkoholos propolisz kivonatok esetén. A törzsekhez (x-tengely) azonos színnel hozzá van rendelve a kapott MIC (y-tengely) és MEC érték (z-tengely).

### 5.5. A baktériumok és *C. albicans* eredményeinek statisztikai elemzése

A Gram-pozitív baktériumok MIC értékei (3,125-400 µg/ml) és a Gram-negatív baktériumok MIC értékei (>13 mg/ml) között szignifikáns különbség volt ( $p < 0,0001$ ).

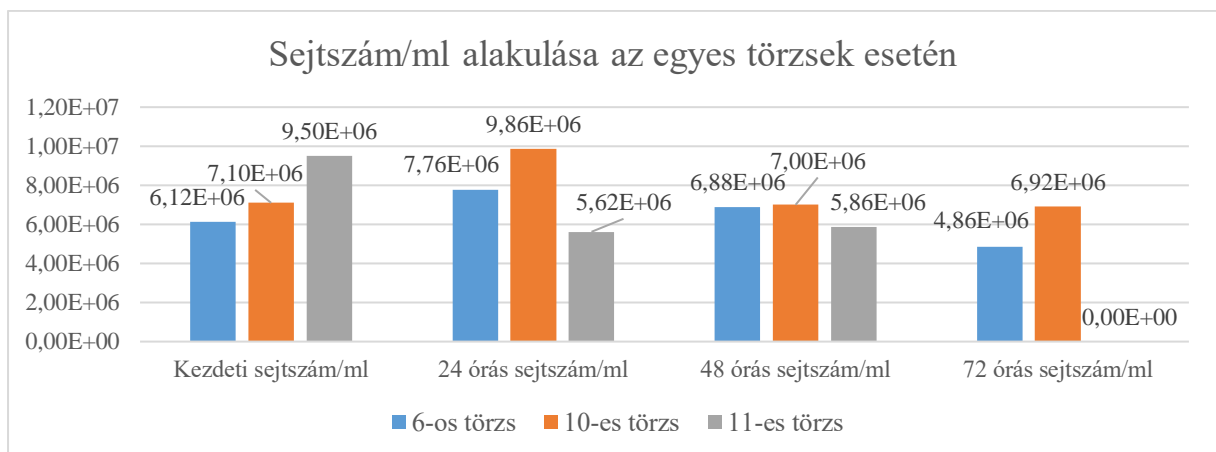
*Staphylococcus* spp. esetén a kapott MIC értékek között szignifikáns különbség nincs ( $p > 0,05$ ), *Enterococcus* spp. esetén viszont a 90%-os és 60%-os, 70%-os, 80%-os kivonatok között ( $p < 0,001$ ), a 96%-os és 80%-os kivonatok között ( $p = 0,0061$ ), valamint a 96%-os és 60%-os kivonat között ( $p < 0,05$ ) és a 96%-os és 70%-os kivonat között ( $p = 0,0012$ ) szignifikáns különbség látszik. *C. albicans* esetén a 96%-os és 60%-os, 70%-os, 80%-os, 90%-os kezelések között ( $p < 0,001$ ), a 96%-os és 60%-os kezelések között ( $p = 0,0250$ ) a 96%-os és 70%-os kezelések között ( $p = 0,0070$ ), a 96%-os és 80%-os kezelések között ( $p = 0,0055$ ) szignifikáns különbség figyelhető meg.

A MEC értékeket vizsgálva *Staphylococcus* spp. esetén nincs szignifikáns különbség ( $p > 0,05$ ). *Enterococcus* spp. esetén a 96%-os és 80%-os kivonatok között ( $p < 0,001$ ), a 90%-

os és 80%-os kivonatok között ( $p < 0,001$ ), valamint a 90%-os és 60%-os ( $p = 0,0010$ ), 70%-os ( $p = 0,0059$ ) kivonatok között, a 96%-os és 60%-os ( $p = 0,0052$ ), 70%-os ( $p = 0,0261$ ) kivonatok között, a 80%-os és 70%-os kivonatok között ( $p = 0,0096$ ), a 80%-os és 60%-os kivonatok között ( $p = 0,0458$ ) szignifikáns különbség látszódik. *C. albicans* esetén viszont csak a 96%-os és 90%-os kivonatok között ( $p < 0,001$ ), valamint a 96%-os és 80%-os kivonatok között ( $p = 0,0072$ ) figyelhető meg szignifikáns különbség.

### 5.6.A *Trichomonas gallinae* életképessége és tenyésztése

A mintagyűjtést követően, 24 óra elteltével, 48 óra elteltével és 72 óra elteltével megszámláltuk a protozoák számát a mintákban. Az eredmények alapján jól látható, hogy a tenyésztő közegünkben a protozoák 48 órás túlélése biztos, sőt a szaporodásuk is megfigyelhető. 48 óra után viszont a protozoák mennyisége csökkent, sőt a 11-es minta esetén el is pusztultak (**8. ábra**). Ez alapján a propolisz hatékonyságának vizsgálata 24 és 48 órás kezelést követően volt megfigyelhető, azonban a 48 órás behatási idő hatása már nem volt elbírálható a 11-es törzs esetén.



**8. ábra** Az egyes *Trichomonas gallinae* törzsek kezdeti, 24 órás és 48 órás sejtszám/ml alakulása

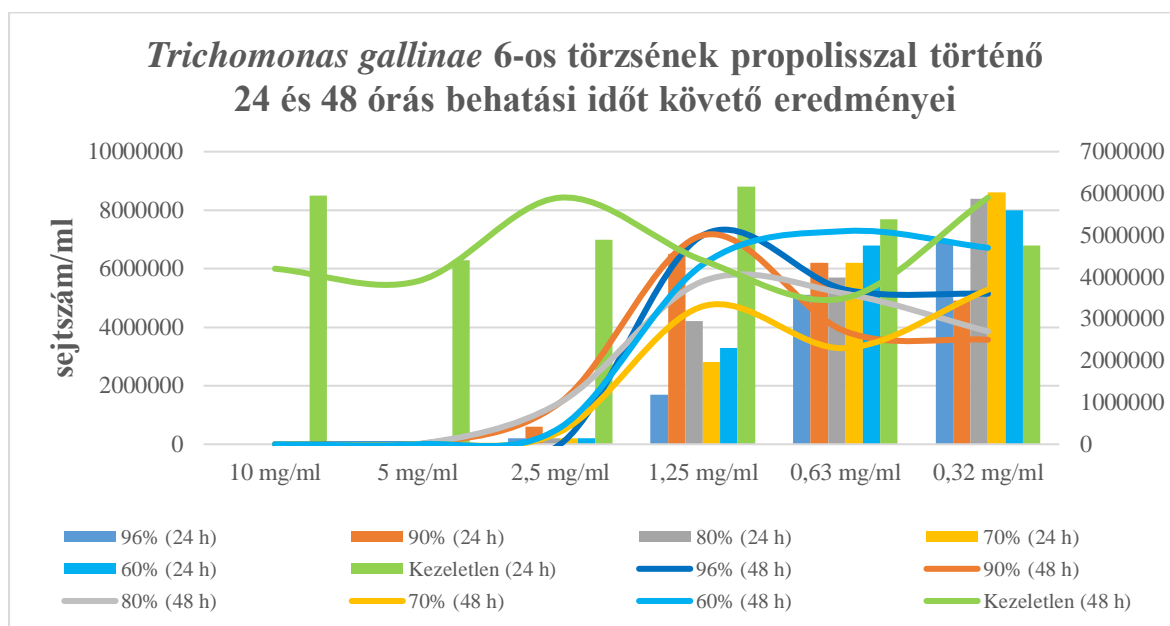
A kezdeti sejtszám/ml-hez képest 24 órát követően a 6-os törzs esetén 27%-os sejtszám növekedés, a 10-es törzs esetén 39%-os, a 11-es törzs esetén pedig 41%-os sejtszám csökkenés volt megfigyelhető. A 48 órás inkubációt követően a kontroll mintákban a sejtszám változásának mértéke a kezdetihez képest a 6-os törzs esetén 12%-kal, a 10-es törzs esetén 1%-kal, a 11-es törzs esetén 38%-kal csökkent. A mintagyűjtés után 72 órával a 6-os törzs 20,6%-os, a 10-es törzs 2,5%-os, a 11-es törzs 100%-os csökkenést mutatott.

Jól tükrözi a kezelések során kontrollként használt sorok sejtszáma is a trophozoiták szaporodását, hiszen a 25x értékre hígított mennyiségük szaporodás nélkül kb.  $2,8 \times 10^5$ /ml protozoát feltételezett volna, azonban 24 óra után ez az érték  $8 \times 10^6$ /ml volt, ami

megközelítőleg a kezdeti számmal egyezett meg, sőt a hígítási sorban folyamatos sejtszám növekedés volt megfigyelhető, egészen  $1,2 \times 10^7$ /ml értékig. Ennek kétféle magyarázata lehetséges, vagy az egyre növekvő tápanyag mennyiségnek köszönhetően volt sikeresebb a szaporodásuk, vagy a koncentráltabb alkoholt tartalmazó hígításoknál volt annak valamennyi szaporodást gátló hatása, ami alól fokozatosan felszabadultak a trophozoiták.

### 5.7. A *Trichomonas gallinae* kezelés eredményei

A vizsgálathoz 3 *Trichomonas gallinae* törzset használtunk: a 6., 10. és 11. törzset. Mindhárom törzs esetén kijelenthető, hogy mind a 24 órás, mind a 48 órás kezelések során az alkoholos kontroll kezelés nem volt hatással a protozoák életképességére.

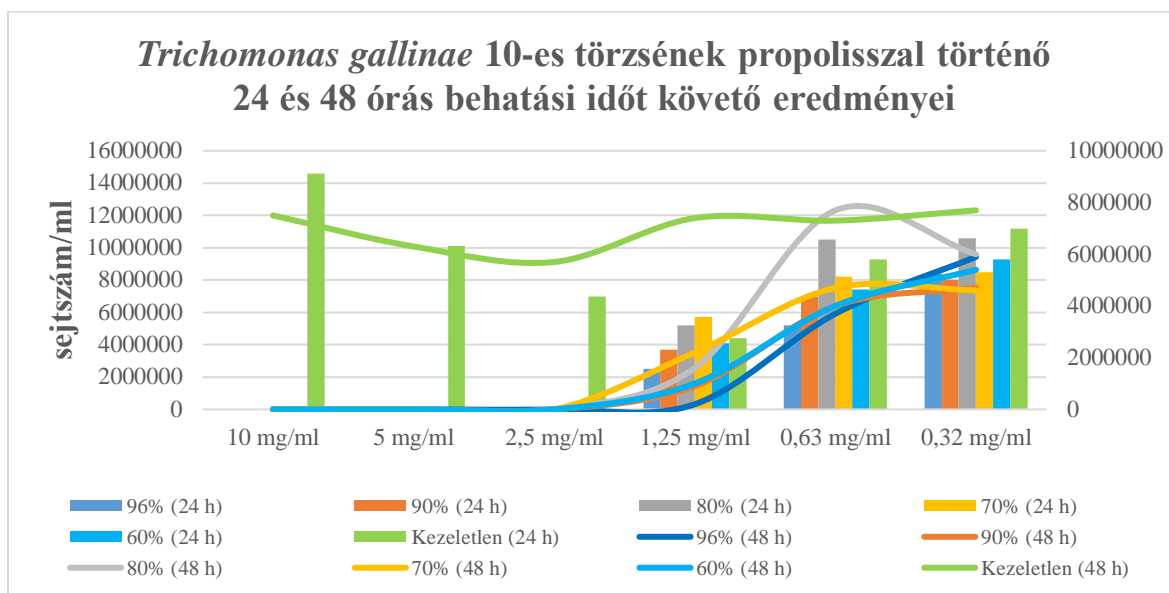


**9. ábra** A *Trichomonas gallinae* 6-os törzsének 24 és 48 órás különböző alkoholos propolisz kivonattal történő kezelésének eredményei

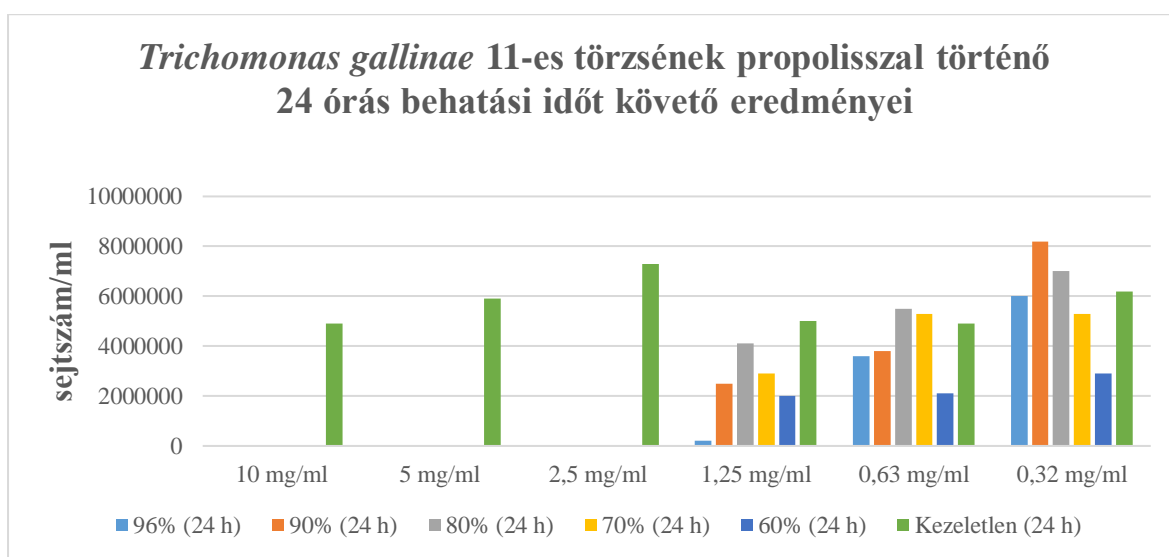
A 96%-os kivonattal történő 24 órás kezelési időt követően a 6-os törzs esetén az 50x hígításig, a 10-es és 11-es törzs esetén a 100x hígításig figyelhető meg teljes eradikáció, tehát a MEC értékünk 2,5-5 mg/ml volt. A sejtszám alakulása alapján a minimális parazitocid koncentráció megegyezik a MEC értékkel. A 48 órás kezelés során már csak a 6-os és 10-es törzsek voltak megítélhetők, előbbi esetén a 100x hígításnál is teljes eradikáció volt megfigyelhető, utóbbinál nem volt változás. Tehát a MEC érték 2,5 mg/ml volt, az inkubációs idő pedig nem növelte a propolisz hatékonyságát (**9. ábra**).

A 90%-os, a 80%-os, a 70%-os és 60%-os kivonattal történő kezelés eredményei teljes mértékben megegyeznek a 96%-os kivonattal tapasztaltakkal, tehát a 24 órás kezelés esetén a MEC és a minimális parazitocid koncentráció 1,1-2,5 mg/ml volt, 48 óra behatási

időt követően pedig az életben maradt kettő törzs esetén 1,1 mg/ml értéket tapasztaltunk (10. ábra).



10. ábra A *Trichomonas gallinae* 10-es törzsének 24 és 48 órás különböző alkoholos propolisz kivonattal történő kezelésének eredményei



11. ábra A *Trichomonas gallinae* 11-es törzsének 24 órás különböző alkoholos propolisz kivonattal történő kezelésének eredményei

A 10-es törzs esetén hasonló módon, a 96%-os kivonat esetén 24 és 48 óra kezelést követően is 2,5 mg/ml, a többi alkoholos kivonat esetén pedig 1,1 mg/ml volt a MEC (8. ábra). A 11-es törzs esetén csak 24 órás kezelést követő adatok álltak rendelkezésre, ami szintén 2,5 mg/ml, valamint 1,1 mg/ml értékek voltak (11. ábra).

### 5.8. A *Trichomonas gallinae* eredményeinek statisztikai elemzése

A kezdeti sejtszám a 6-os törzs esetén 24 óra inkubációt követően szignifikáns növekedést mutatott ( $p=0,0028$ ), ami 48 óra után már inkább stagnált ( $p=0,3452$ ), 72 óra

után viszont szignifikáns módon csökkent ( $p=0,0339$ ). A 10-es törzs esetén a kezdeti sejtszám 24 óra után szignifikáns növekedést mutatott ( $p=0,0050$ ), azonban ehhez képest a 48 órás ( $p=0,9993$ ) és 72 órás sejtszám ( $p=0,9961$ ) nem mutatott szignifikáns különbséget. Viszont a 24 órás növekedéshez képest a 48 órás ( $p=0,0035$ ) és a 72 órás ( $p=0,0024$ ) értékek esetén szignifikáns csökkenést tapasztaltunk. A 48 órás és 72 órás trophozoita szám azonban már stagnált ( $p=0,9996$ ). A 11-es törzs esetén a kezdeti sejtszámhoz képest 24 óra után, 48 óra után és 72 óra után is szignifikáns sejtszám csökkenést figyeltünk meg ( $p<0,00001$ ), amit, ha 24 és 48 óra esetén 72 órához hasonlítottuk, szintén szignifikáns csökkenést jelentett ( $p<0,00001$ ). Egyedül 24 óra és 48 óra között volt a sejtszám hasonló ( $p=0,9740$ ).

A 6-os törzs 24 órás kezelése esetén az alkohol kivonatok tekintetében szignifikáns különbség a hatékonyságban nem volt ( $p=0,2927$ ), a hígítás mértéke viszont szignifikáns különbséget mutatott ( $p<0,0001$ ), kivétel ez alól a 25x, 50x és 100x hígítások, melyek esetén nulla volt a sejtszám ( $p=1$ ). A 48 órás kezelés esetében az alkohol kivonatok már szignifikáns különbséget mutattak ( $p=0,0020$ ), és a hígítás mértéke szintén nagymértékben meghatározó volt ( $p<0,0001$ ).

A 10-es törzs 24 órás kezelése esetén az egyes alkohol kivonatok hatékonysága között nem volt szignifikáns különbség ( $p>0,05$ ). Az egyes hígítások között viszont szignifikáns különbség volt ( $p<0,0001$ ), kivétel ez alól a 25x, 50x és 100x hígítások, melyek esetén nulla volt a sejtszám ( $p=1$ ). A 48 órás kezelést vizsgálva az egyes alkoholos kivonatok hatékonysága között nem volt megfigyelhető szignifikáns különbség ( $p>0,05$ ). Az egyes hígítások viszont szignifikáns különbséget mutattak ( $p<0,0001$ ), kivétel itt is a nulla sejtszámot mutató 25x, 50x, 100x hígítás ( $p=1$ ).

A 11-es törzs esetén csak a 24 órás kezelést tudtuk vizsgálni, ugyanis a 48 órás időpontra minden trophozoita elpusztult. A különböző alkohol kivonatok hatékonysága között itt sem volt megfigyelhető szignifikáns különbség ( $p>0,05$ ), a hígítás viszont szignifikáns különbséget mutatott ( $p<0,0001$ ), kivétel ez alól a nulla sejtszámot mutató 25x, 50x és 100x hígítások voltak ( $p=1$ ).

Összességében elmondható, hogy az egyes törzseknél a különböző alkohol kivonatok hatékonysága között a MEC értékek tekintetében nincs szignifikáns különbség ( $p>0,05$ ).

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK

A szakirodalomban leírt Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok közötti hatékonyságon belüli különbséget [7, 27–29] a mi vizsgálataink is alátámasztották, előbbiek esetében 3,125-400 µg/ml, utóbbiak esetén pedig >13 mg/ml MIC értékeket találtunk.

A különböző töménységű etanolos kivonatok hatékonysága között *Staphylococcus* spp. esetén nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget ( $p > 0,05$ ). A 96%-os kivonat esetén 3,125-50 µg/ml közötti MIC értékeket tapasztaltunk, míg Mavri és mtsai. 150 és 290 µg/ml MIC-értékeket írtak le [57]. A 90%-os kivonat esetén 1,5-50 µg/ml közötti MIC-értékeket kaptunk. Ebben az esetben összehasonlító irodalom nem áll rendelkezésre. A 80%-os, a 70%-os és a 60%-os kivonatok esetén látható mértékben emelkedett a MIC érték a korábbi kivonatokhoz képest, átlagosan 50-400 µg/ml koncentrációkat figyeltünk meg. Hasonlóan a saját eredményekhez iráni propoliszok esetén 150-250 µg/ml MIC-értékeket írtak le 80%-os etanolos kivonatot alkalmazva [58, 59]. 70%-os görög propolisz tinktúra esetén 120 µg/ml koncentráció bizonyult hatékonynak [36], El Menyiy és mtsai. azonban 2 µg/ml koncentráció esetén is hatékonynak találták azt [55], ezzel szemben Hegazi és mtsai. 2400 és 4600 µg/ml MIC-értéket írtak le [50]. 60%-os kivonat esetén pedig 20 µg/ml MIC-értéket is leírtak [47].

*Enterococcus* spp. esetén a 96%-os és 90%-os kivonat szignifikánsan hatékonyabbnak bizonyult a többi etanolos tinktúrájánál ( $p < 0,0001$ ). 96%-os tinktúra esetén a MIC értékek 6,5 és 50 µg/ml között alakultak. Ezzel szemben Mavri és mtsai. csupán 1200 µg/ml esetén figyeltek meg hatékonyságot [57]. A 90%-os kivonat szintén hatékony volt 1,56-12,5 µg/ml koncentrációknál. Itt összehasonlító irodalom nem áll rendelkezésre. A 80%-os tinktúrájánál 100-400 µg/ml koncentráció volt hatékony a kísérletünkben, ehhez hasonlóan iráni propoliszok esetén 250-300 µg/ml MIC-értékeket írtak le [58, 59]. Ezzel szemben Campos és mtsai. kísérletében a MIC 880 és 1020 µg/ml között alakult [43]. 70%-os kivonat esetén 100-200 µg/ml koncentrációk hatékonyságát találtuk a vizsgálataink során. El Menyiy és mtsai. ehhez hasonlóan leírtak 70 µg/ml MIC értéket [55], továbbá 170 és 625 µg/ml közötti MIC-értékeket tapasztaltak palesztin propolisz esetén [56]. Ezzel szemben szlovén propolisz esetén csupán 1400 µg/ml koncentráció volt hatékony [57]. Vizsgálataink során 60%-os kivonat esetén 50 és 200 µg/ml közötti koncentrációk voltak hatékonyak.

*E. coli* törzsek vizsgálatai során a propolisz egyik kivonata esetén sem tudtuk megállapítani a hatékony gátló koncentrációt. A MIC értékek egy eset kivételével mindig



nagyobbak voltak, mint 13 mg/ml. Egy esetben gátolta a 13 mg/ml-es koncentráció a baktériumok növekedését. A szakirodalomban is hasonló értékeket találtunk. Szerb propolisz vizsgálata során 2,5-10 mg/ml közötti volt a MIC [27]. Hegazi és mtsai. szintén magas, 1,6 mg/ml MIC értéket találtak [50], továbbá egyiptomi és szaúd-arábiai propolisz esetén 2,5 és 1,5 mg/ml koncentráció volt csak hatékony [60]. Ezzel szemben Nina és mtsai. már 31,2 µg/ml koncentrációnál hatékony gátló hatást írtak le [78] [65], valamint chilei propolisz esetén 31,5 µg/ml MIC értéket figyeltek meg [52].

A *S. enterica* esetén a propolisz hasonlóan az *E. coli*-hoz nem mutatott kellő hatékonyságot. A MIC minden esetben nagyobb volt, mint 13 mg/ml. Szerbiai propolisz esetén 10 mg/ml koncentráció volt hatékony [27], továbbá szlovén propolisz esetén 580 µg/ml és 1,4 mg/ml között voltak a MIC értékek [57]. Egyes esetekben találtak hatékonyak bizonyuló MIC értékeket is, melyek 62,5 µg/ml [52] és 125 µg/ml [65] koncentrációk voltak.

*C. albicans* esetén a 96%-os és összes többi kivonat között figyeltünk meg szignifikáns különbséget ( $p < 0,0001$ ). A 96%-os kivonat hatékonyak bizonyult 1,56-50 µg/ml MIC értékek mellett. Boisard és mtsai. kísérletében hasonlóan hatékony volt a propolisz, 31,25 µg/ml koncentrációban [78]. Azonban szerb propolisz esetén csupán 625 µg/ml és 5000 µg/ml közötti MIC értékeket találtak [27]. A 90%-os kivonat egyértelműen a legkevésbé volt hatékony a többi etanolos kivonatokhoz képest, konstans 400 µg/ml MIC értékkel. A 80%-os, 70%-os és 60%-os kivonatok hasonló hatékonyságot mutattak 100-400 µg/ml közötti MIC értékekkel, egy-két kiugró értéket leszámítva. Azonban 80%-os kivonat esetén kimagasló hatékonyságot is leírtak 11 µg/ml és 14,5 µg/ml közötti MIC értékkel [79]. 70%-os kivonat vizsgálata során a 96%-os kivonatokhoz hasonlóan itt is 31,25 µg/ml MIC értéket találtak [78]. Azonban német propolisz esetén csupán 4048-5000 µg/ml közötti MIC értékek voltak hatékonyak [49, 50].

A *Trichomonas gallinae* kezelések során a kivonatok között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget ( $p > 0,05$ ). 24 órás kezelést követően a MEC értékek 1,1-5 mg/ml között változtak az alkalmazott etanol töménységétől függetlenül. A 48 órás kezelést követően a MEC érték minden esetben 2,5 mg/ml volt. Összehasonlító irodalom csupán a propolisz vizes kivonatát alkalmazva áll rendelkezésre, ahol a paraziták 100%-os eradikációja csupán 75 mg/ml koncentrációnál következett be [90].

Eredményeink alapján elmondható, hogy a Gram-pozitív baktériumok okozta külső fertőzések (pl.: bőrgyulladások, tüdőgyulladások) kezelésére a propolisz hatékony alternatív kezelés lehet, azonban ehhez további *in vivo* vizsgálatok szükségesek

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Napjaink egyik legsúlyosabb humán- és állategészségügyi problémáját az antimikrobiális szerekkel szembeni rezisztencia terjedése jelenti. Antibiotikum alternatívák használatával jelentős mértékben csökkenthetjük a rezisztencia kialakulásának esélyét. A propolisz antibakteriális, gombaellenes, parazitaellenes hatással bíró természetes anyag, fő biológiai hatásáért aktív kémiai komponensek, polifenolok és terpenoidok felelősek. A szakirodalomban galambokból izolált *Trichomonas gallinae* törzsön kizárólag a propolisz vizes oldatának hatékonyságát vizsgálták, melynek az eredménye messze elmarad más protozoák esetén mért etanolos kivonatokhoz képest. Magyarországi eredetű etanolos propolisz kivonatnak a hatékonyságát galambokból izolált baktérium és gomba törzsekre idáig senki sem vizsgálta. Jelen tanulmány célja, hogy meghatározzuk hazai eredetű propolisz különböző töménységű etanolos kivonatának *in vitro* hatékonyságát galambból izolált *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *E. coli*, *S. enterica*, *Trichomonas gallinae*, valamint *C. albicans* esetén. Elsőként vizsgáltuk propolisz etanolos kivonatának hatékonyságát galambból izolált *Trichomonas gallinae* törzsek ellen.

Kimutattuk, hogy az észak-alföldi régióból származó propolisz hatékonyan gátolja a Gram-pozitív baktériumok, a *C. albicans* és a *Trichomonas gallinae* törzsek szaporodását. Mindegyik baktériumfajból és *C. albicans* élesztőből 8-8 db törzset vizsgáltunk. A 80%-os, 70%-os és 60%-os kivonatok nem mutattak szignifikánsan eltérő hatékonyságot egymáshoz képest, a 96%-os és 90%-os kivonatok viszont előbbiekhöz képest hatékonyabbnak bizonyultak. *Staphylococcus* fajok esetén a MIC-értékek 12,5-100 µg/ml között voltak, *Enterococcus* spp. tekintetében 12,5-100 µg/ml közötti MIC értékeket találtunk. *E. coli* és *S. enterica* fajok esetén >13 mg/ml MIC értéket tapasztaltunk. *C. albicans* tekintetében 3,125-50 µg/ml közötti MIC értékek voltak hatékonyak. Három *Trichomonas gallinae* törzs vizsgálata során 1,1-5 mg/ml közötti koncentrációk használata során tapasztaltunk jelentős protozoaellenes hatást.

Az észak-alföldi régióból származó etanolos propolisz kivonatának hatékonysága a szakirodalomban leírt MIC értékekhez hasonlóan Gram-pozitív baktériumok esetén sokkal jobb hatékonyságot mutatott (12,5-100 µg/ml), mint Gram-negatív baktériumok ellen (>13 mg/ml). *Trichomonas gallinae* esetén nem áll rendelkezésre összehasonlító szakirodalom, vizsgálatunk során a propolisz 1,1-5 mg/ml koncentrációját hatékonyan találtuk. Alternatív antimikrobiális kezelésében való felhasználási lehetőségeinek megerősítése érdekében javasolt *in vivo* vizsgálatok elvégzése.

## 8. SUMMARY

One of the most common human and animal health issues today is the spread of resistance against antimicrobial agents. By using antibiotic alternatives, we can significantly reduce the chance of developing resistance. For pigeons there is no antibiotic approved other than ronidazole, yet resistance is spreading. Propolis is an antibacterial, antifungal and antiparasitic natural product, active chemical components such as polyphenols and terpenoids are responsible for its main biological activities. Only the effectiveness of aqueous extract of propolis has been studied worldwide, but its efficacy has been found significantly lower than ethanolic extracts of propolis measured for other protozoa. The efficacy of Hungarian propolis on bacterial and fungal strains isolated from pigeons has not been studied so far. The aim of this study is to determine the *in vitro* efficacy of different concentrations of ethanolic extracts of propolis from the region „Észak-Alföld” on *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *E. coli*, *S. enterica*, *Trichomonas gallinae*, and *C. albicans* isolated from pigeons. We are the first who examined the efficacy of ethanolic extracts of propolis on *Trichomonas gallinae* isolated from pigeons.

We showed that propolis from region „Észak-Alföld” significantly inhibit the growth of some Gram-positive bacterial strains, moreover, the growth of *C. albicans* and *Trichomonas gallinae* was also hindered. We examined 8-8 types of *C. albicans* and bacterial strains. The results of different concentrations of extracts (80%, 70%, 60%) - except the 96% and 90% ethanolic extract, have not shown significant difference. The MIC values were 12.5-100 µg/ml for *Staphylococcus spp.* and *Enterococcus spp.* In *E. coli* and *S. enterica* the MIC values were >13 mg/ml. The ethanolic extracts of propolis were active against *C. albicans* with MIC values from 3.125 to 50 µg/ml. In the case of the 60% ethanolic extract the MICs were 5.78 mg/ml for *Enterococcus spp.* and *C. albicans*. In the case of the three *Trichomonas gallinae* strains significant antiprotozoal activity was observed at concentrations ranging from 1.1 to 5 mg/ml.

The ethanolic extract of propolis from the region „Észak-Alföld” was more effective against Gram-positive (3.125-50 µg/ml), than Gram-negative bacteria (>5.78 mg/ml), similar to the MIC values described in the literature. In the case of *Trichomonas gallinae* no comparative literature is available, in our study the propolis concentrations of 1,1-5 mg/ml were found to be effective. *In vivo* studies are recommended to confirm the propolis' potential use as an alternative antibacterial, antifungal agent and in the treatment of *Trichomonas* infections.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Santos LM, Fonseca MS, Sokolonski AR, Deegan KR, Araújo RP, Umsza-Guez MA, Barbosa JD, Portela RD, Machado BA (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>
2. 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>
3. Aygun A, Sert D (2013) Effects of prestorage application of propolis and storage time on eggshell microbial activity, hatchability, and chick performance in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) eggs. *Poultry Science* 92:3330–3337 . <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03291>
4. Ding J, Matsumiya T, Hayakari R, Shiba Y, Kawaguchi S, Seya K, Ueno K, Imaizumi T (2021) Daily Brazilian green propolis intake elevates blood artemisinin C levels in humans. *J Sci Food Agric*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11132>
5. 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>
6. Regueira-Neto M da S, Tintino SR, Rolón M, Coronel 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>
7. Przybyłek I, Karpiński TM (2019) Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules* 24: . <https://doi.org/10.3390/molecules24112047>
8. AL-Waili N, Al-Ghamdi A, Ansari MJ, Al-Attal Y, Salom K (2012) Synergistic Effects of Honey and Propolis toward Drug Multi-Resistant *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli* and *Candida Albicans* Isolates in Single and Polymicrobial Cultures. *Int J Med Sci* 9:793–800 . <https://doi.org/10.7150/ijms.4722>
9. Wrona O, Rafińska K, Możejński C, Buszewski B (2017) Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials. *J AOAC Int* 100:1624–1635 . <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0232>
10. Devequi-Nunes D, Machado BAS, Barreto G de A, Rebouças Silva J, da Silva DF, da Rocha JLC, Brandão HN, Borges VM, Umsza-Guez MA (2018) Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PLoS One* 13:e0207676 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207676>
11. Veiga RS, Mendonça SD, Mendes PB, Paulino N, Mimica MJ, Netto AAL, Lira IS, López BG-C, Negrão V, Marcucci MC (2017) Artemisinin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *Journal of Applied Microbiology* 122:911–920 . <https://doi.org/10.1111/jam.13400>
12. Afrouzan H, Tahghighi A, Zakeri S, Es-haghi A (2018) Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Iranian Propolis. *Iran Biomed J* 22:50–65 . <https://doi.org/10.22034/ibj.22.1.50>
13. 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>
14. 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* 10:428 . <https://doi.org/10.3390/biology10050428>
15. 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. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015:206439 . <https://doi.org/10.1155/2015/206439>

16. 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>
17. 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>
18. Bueno-Silva B, Marsola A, Ikegaki M, Alencar SM, Rosalen PL (2017) The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity. *Natural Product Research* 31:1318–1324 . <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1239088>
19. Scazzocchio F, D’Auria FD, Alessandrini D, Pantanella F (2006) Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research* 161:327–333 . <https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.12.003>
20. Stepanović S, Antić N, Dakić I, Svabić-Vlahović M (2003) In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol Res* 158:353–357 . <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00215>
21. Gucwa K, Kusznierevicz B, Milewski S, Van Dijck P, Szweda P (2018) Antifungal Activity and Synergism with Azoles of Polish Propolis. *Pathogens* 7:56 . <https://doi.org/10.3390/pathogens7020056>
22. Liberio SA, Pereira ALA, Dutra RP, Reis AS, Araújo MJAM, Mattar NS, Silva LA, Ribeiro MNS, Nascimento FRF, Guerra RNM, Monteiro-Neto V (2011) Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complement Altern Med* 11:108 . <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-108>
23. Attia YA, Al-Khalaifah H, Ibrahim MS, Al-Hamid AEA, Al-Harhi MA, El-Naggar A (2017) Blood Hematological and Biochemical Constituents, Antioxidant Enzymes, Immunity and Lymphoid Organs of Broiler Chicks Supplemented with Propolis, Bee Pollen and Mannan Oligosaccharides Continuously or Intermittently. *Poultry Science* 96:4182–4192 . <https://doi.org/10.3382/ps/pex173>
24. Állatállomány, 2019. december 1. <https://www.ksh.hu/docs/hun/xftp/stattukor/allat/2019/index.html>. Accessed 8 Oct 2021
25. Ghanbarpour R, Aflatoonian MR, Askari A, Abiri Z, Naderi Z, Bagheri M, Jajarmi M, Shobeiri S, Molaei R, Askari N (2020) Domestic and game pigeons as reservoirs for *Escherichia coli* harbouring antimicrobial resistance genes. *J Glob Antimicrob Resist* 22:571–577 . <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.02.015>
26. Alhababi DA, Eltai NO, Nasrallah GK, Farg EA, Al Thani AA, Yassine HM (2020) Antimicrobial Resistance of Commensal *Escherichia coli* Isolated from Food Animals in Qatar. *Microb Drug Resist* 26:420–427 . <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0402>
27. Stepanović S, Antić N, Dakić I, Svabić-Vlahović M (2003) In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol Res* 158:353–357 . <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00215>
28. Zulhendri F, Chandrasekaran K, Kowacz M, Ravalía M, Kripal K, Fearnley J, Perera CO (2021) Antiviral, Antibacterial, Antifungal, and Antiparasitic Properties of Propolis: A Review. *Foods* 10:1360 . <https://doi.org/10.3390/foods10061360>
29. Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC (1997) Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol Res* 152:239–246 . [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(97\)80034-1](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(97)80034-1)
30. Nina N, Lima B, Feresin GE, Giménez A, Capusiri ES, Schmeda-Hirschmann G (2016) Antibacterial and leishmanicidal activity of Bolivian propolis. *Letters in Applied Microbiology* 62:290–296 . <https://doi.org/10.1111/lam.12543>
31. Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC (1997) Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol Res* 152:239–246 . [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(97\)80034-1](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(97)80034-1)

32. Taylor TA, Unakal CG (2021) *Staphylococcus Aureus*. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)
33. Bystron J, Podkowik M, Piasecki T, Wieliczko A, Molenda J, Bania J (2010) Genotypes and enterotoxin gene content of *S. aureus* isolates from poultry. *Veterinary Microbiology* 144:498–501 . <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.01.029>
34. Haag AF, Fitzgerald JR, Penadés JR (2019) *Staphylococcus aureus* in Animals. *Microbiology Spectrum* 7:7.3.11 . <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0060-2019>
35. Ristivojević P, Dimkić I, Trifković J, Berić T, Vovk I, Milojković-Opsenica D, Stanković S (2016) Antimicrobial Activity of Serbian Propolis Evaluated by Means of MIC, HPTLC, Bioautography and Chemometrics. *PLoS One* 11:e0157097 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157097>
36. Popova MP, Chinou IB, Marekov IN, Bankova VS (2009) Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry* 70:1262–1271 . <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.025>
37. Sforcin JM, Fernandes A, Lopes CA, Bankova V, Funari SR (2000) Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 73:243–249 . [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(00\)00320-2](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(00)00320-2)
38. Campos JF, dos Santos UP, Macorini LFB, de Melo AMMF, Balestieri JBP, Paredes-Gamero EJ, Cardoso CAL, de Picoli Souza K, dos Santos EL (2014) Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food and Chemical Toxicology* 65:374–380 . <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.008>
39. Regueira MS, Tintino SR, da Silva ARP, Costa M do S, Boligon AA, Matias EFF, de Queiroz Balbino V, Menezes IRA, Melo Coutinho HD (2017) Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food and Chemical Toxicology* 107:572–580 . <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.052>
40. Bittencourt MLF, Ribeiro PR, Franco RLP, Hilhorst HWM, de Castro RD, Fernandez LG (2015) Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. *Food Research International* 76:449–457 . <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.008>
41. Moncla BJ, Guevara PW, Wallace JA, Marcucci MC, Nor JE, Bretz WA (2012) The Inhibitory Activity of Typified Propolis against *Enterococcus* Species. *Zeitschrift für Naturforschung C* 67:249–256 . <https://doi.org/10.1515/znc-2012-5-603>
42. da Cunha MG, Franchin M, Galvão L, de Ruiz A, de Carvalho JE, Ikegaki M, de Alencar SM, Koo H, Rosalen PL (2013) Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13:23 . <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-23>
43. Campos JF, Santos UP dos, Rocha P dos S da, Damião MJ, Balestieri JBP, Cardoso CAL, Paredes-Gamero EJ, Estevinho LM, de Picoli Souza K, Santos EL dos (2015) Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jatai). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015:e296186 . <https://doi.org/10.1155/2015/296186>
44. Suleman T, van Vuuren S, Sandasi M, Viljoen AM (2015) Antimicrobial activity and chemometric modelling of South African propolis. *J Appl Microbiol* 119:981–990 . <https://doi.org/10.1111/jam.12906>
45. da Cruz Almeida ET, da Silva MCD, Oliveira JMDS, Kamiya RU, Arruda REDS, Vieira DA, Silva V da C, Escodro PB, Basílio-Júnior ID, do Nascimento TG (2017) Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. *J Pharm Anal* 7:280–287 . <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2017.03.004>
46. Silva RPD, Machado BAS, Barreto G de A, Costa SS, Andrade LN, Amaral RG, Carvalho AA, Padilha FF, Barbosa JDV, Umsza-Guez MA (2017) Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *PLOS ONE* 12:e0172585 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172585>
47. Chen Y-W, Ye S-R, Ting C, Yu Y-H (2018) Antibacterial activity of propolis from Taiwanese green propolis. *J Food Drug Anal* 26:761–768 . <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.10.002>

48. Patel J, Ketkar S, Patil S, Fearnley J, Mahadik KR, Paradkar AR (2015) Potentiating antimicrobial efficacy of propolis through niosomal-based system for administration. *Integrative Medicine Research* 4:94–101 . <https://doi.org/10.1016/j.imr.2014.10.004>
49. AL-Ani I, Zimmermann S, Reichling J, Wink M (2018) Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. *Medicines* 5:2 . <https://doi.org/10.3390/medicines5010002>
50. Hegazi AG, Hady FKAE, Allah FAMA (2000) Chemical Composition and Antimicrobial Activity of European Propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C* 55:70–75 . <https://doi.org/10.1515/znc-2000-1-214>
51. Bridi R, Montenegro G, Nuñez-Quijada G, Giordano A, Morán-Romero MF, Jara-Pezoa I, Speisky H, Atala E, López-Alarcón C (2015) International Regulations of Propolis Quality: Required Assays do not Necessarily Reflect their Polyphenolic-Related In Vitro Activities. *Journal of Food Science* 80:C1188–C1195 . <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12881>
52. Nina N, Quispe C, Jiménez-Aspee F, Theoduloz C, Feresín GE, Lima B, Leiva E, Schmeda-Hirschmann G (2015) Antibacterial Activity, Antioxidant Effect and Chemical Composition of Propolis from the Región del Maule, Central Chile. *Molecules* 20:18144–18167 . <https://doi.org/10.3390/molecules201018144>
53. Popova M, Dimitrova R, Al-Lawati HT, Tsvetkova I, Najdenski H, Bankova V (2013) Omani propolis: chemical profiling, antibacterial activity and new propolis plant sources. *Chemistry Central Journal* 7:158 . <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-158>
54. El-Guendouz S, Aazza S, Lyoussi B, Bankova V, Popova M, Neto L, Faleiro ML, Miguel M da G (2018) Moroccan Propolis: A Natural Antioxidant, Antibacterial, and Antibiofilm against *Staphylococcus aureus* with No Induction of Resistance after Continuous Exposure. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2018:e9759240 . <https://doi.org/10.1155/2018/9759240>
55. El Menyiy N, Bakour M, El Ghouizi A, El Guendouz S, Lyoussi B (2021) Influence of Geographic Origin and Plant Source on Physicochemical Properties, Mineral Content, and Antioxidant and Antibacterial Activities of Moroccan Propolis. *Int J Food Sci* 2021:5570224 . <https://doi.org/10.1155/2021/5570224>
56. Touzani S, Imtara H, Katekhaye S, Mechchate H, Ouassou H, Alqahtani AS, Noman OM, Nasr FA, Fearnley H, Fearnley J, Paradkar A, ElArabi I, Lyoussi B (2021) Determination of Phenolic Compounds in Various Propolis Samples Collected from an African and an Asian Region and Their Impact on Antioxidant and Antibacterial Activities. *Molecules* 26:4589 . <https://doi.org/10.3390/molecules26154589>
57. Mavri A, Abramovič H, Polak T, Bertonecelj J, Jamnik P, Smole Možina S, Jeršek B (2012) Chemical Properties and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Slovenian Propolis. *Chemistry & Biodiversity* 9:1545–1558 . <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100337>
58. Nazeri R, Ghaiour M, Abbasi S (2019) Evaluation of Antibacterial Effect of Propolis and its Application in Mouthwash Production. *Front Dent* 16:1–12 . <https://doi.org/10.18502/vid.v16i1.1103>
59. Jafarzadeh Kashi TS, Kasra Kermanshahi R, Erfan M, Vahid Dastjerdi E, Rezaei Y, Tabatabaei FS (2011) Evaluating the In-vitro Antibacterial Effect of Iranian Propolis on Oral Microorganisms. *Iran J Pharm Res* 10:363–368
60. Al-Waili N, Al-Ghamdi A, Ansari MJ, Al-Attal Y, Salom K (2012) Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. *Int J Med Sci* 9:793–800 . <https://doi.org/10.7150/ijms.4722>
61. Massaro CF, Simpson JB, Powell D, Brooks P (2015) Chemical composition and antimicrobial activity of honeybee (*Apis mellifera ligustica*) propolis from subtropical eastern Australia. *Sci Nat* 102:68 . <https://doi.org/10.1007/s00114-015-1318-z>
62. Wojtyczka RD, Dziedzic A, Idzik D, Kępa M, Kubina R, Kabała-Dzik A, Smoleń-Dzirba J, Stojko J, Sajewicz M, Wąsik TJ (2013) Susceptibility of *Staphylococcus aureus* clinical isolates to propolis extract alone or in combination with antimicrobial drugs. *Molecules* 18:9623–9640 . <https://doi.org/10.3390/molecules18089623>

63. Grecka K, Kuś PM, Okińczyc P, Worobo RW, Walkusz J, Szweda P (2019) The Anti-Staphylococcal Potential of Ethanolic Polish Propolis Extracts. *Molecules* 24:E1732 . <https://doi.org/10.3390/molecules24091732>
64. 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>
65. 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>
66. Wanger A, Chavez V, Huang RSP, Wahed A, Actor JK, Dasgupta A (2017) Chapter 6 - Overview of Bacteria. In: Wanger A, Chavez V, Huang RSP, Wahed A, Actor JK, Dasgupta A (eds) *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology*. Elsevier, pp 75–117
67. Moncla BJ, Guevara PW, Wallace JA, Marcucci MC, Nor JE, Bretz WA (2012) The inhibitory activity of typhoid propolis against *Enterococcus* species. *Z Naturforsch C J Biosci* 67:249–256 . <https://doi.org/10.1515/znc-2012-5-603>
68. Lim JY, Yoon JW, Hovde CJ (2010) A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol* 20:5–14
69. Percival SL, Williams DW (2014) Chapter Six - *Escherichia coli*. In: Percival SL, Yates MV, Williams DW, Chalmers RM, Gray NF (eds) *Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition)*. Academic Press, London, pp 89–117
70. Lavigne J-P, Ranfaing J, Dunyach-Rémy C, Sotto A (2020) Synergistic Effect of Propolis and Antibiotics on Uropathogenic *Escherichia coli*. *Antibiotics (Basel)* 9:E739 . <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110739>
71. Pasmans F, Baert K, Martel A, Bousquet-Melou A, Lanckriet R, De Boever S, Van Immerseel F, Eeckhaut V, de Backer P, Haesebrouck F (2008) Induction of the Carrier State in Pigeons Infected with *Salmonella enterica* Subspecies *enterica* Serovar Typhimurium PT99 by Treatment with Florfenicol: a Matter of Pharmacokinetics. *Antimicrob Agents Chemother* 52:954–961 . <https://doi.org/10.1128/AAC.00575-07>
72. Sudbery PE (2011) Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol* 9:737–748 . <https://doi.org/10.1038/nrmicro2636>
73. Hernday AD, Noble SM, Mitrovich QM, Johnson AD (2010) Chapter 31 - Genetics and Molecular Biology in *Candida albicans*. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 737–758
74. Dowd FJ (2014) *Candida Albicans* Infections☆. In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier
75. Oliveira ACP, Shinobu CS, Longhini R, Franco SL, Svidzinski TIE (2006) Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101:493–497 . <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000500002>
76. Ota C, Unterkircher C, Fantinato V, Shimizu MT (2001) Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses* 44:375–378 . <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2001.00671.x>
77. Berretta AA, de Castro PA, Cavalheiro AH, Fortes VS, Bom VP, Nascimento AP, Marquele-Oliveira F, Pedrazzi V, Ramalho LN, Goldman GH (2013) Evaluation of Mucoadhesive Gels with Propolis (EPP-AF) in Preclinical Treatment of Candidiasis Vulvovaginal Infection. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013:e641480 . <https://doi.org/10.1155/2013/641480>
78. Boisard S, Le Ray A-M, Landreau A, Kempf M, Cassisa V, Flurin C, Richomme P (2015) Antifungal and Antibacterial Metabolites from a French Poplar Type Propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015:319240 . <https://doi.org/10.1155/2015/319240>
79. 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>



80. Pobiega K, Kraśniewska K, Przybył JL, Bączek K, Żubernik J, Witrowa-Rajchert D, Gniewosz M (2019) Growth Biocontrol of Foodborne Pathogens and Spoilage Microorganisms of Food by Polish Propolis Extracts. *Molecules* 24:2965 . <https://doi.org/10.3390/molecules24162965>
81. Gucwa K, Kusznierevicz B, Milewski S, Van Dijck P, Szweda P (2018) Antifungal Activity and Synergism with Azoles of Polish Propolis. *Pathogens* 7:E56 . <https://doi.org/10.3390/pathogens7020056>
82. 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>
83. Torres-Santos EC, Sampaio-Santos MI, Buckner FS, Yokoyama K, Gelb M, Urbina JA, Rossi-Bergmann B (2009) Altered sterol profile induced in *Leishmania amazonensis* by a natural dihydroxymethoxylated chalcone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63:469–472 . <https://doi.org/10.1093/jac/dkn546>
84. 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>
85. 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>
86. 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>
87. 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>
88. 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>
89. Tully TN, Lawton MPC, Dorrestein GM (2000) *Avian medicine*. Butterworth-Heinemann, Oxford Boston
90. 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>
91. de Oliveira Dembogurski DS, Silva Trentin D, Boaretto AG, Rigo GV, da Silva RC, Tasca T, Macedo AJ, Carollo CA, Silva DB (2018) Brown propolis-metabolomic innovative approach to determine compounds capable of killing *Staphylococcus aureus* biofilm and *Trichomonas vaginalis*. *Food Res Int* 111:661–673 . <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.033>
92. 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>
93. Gunetti M, Castiglia S, Rustichelli D, Mareschi K, Sanavio F, Muraro M, Signorino E, Castello L, Ferrero I, Fagioli F (2012) Validation of analytical methods in GMP: The disposable Fast Read 102® device, an alternative practical approach for cell counting. *Journal of translational medicine* 10:112 . <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-112>

## 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, dr. Kerek Ádámnak, aki szakmai irányításával és kitartó munkájával segítette megvalósítani a kutatásomat. Továbbá köszönettel tartozom dr. Jerzsele Ákosnak, a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék vezetőjének, akinek az irányítása nélkül nem valósulhatott volna meg a diákköri munkám.

Köszönöm dr. Berta Krisztián segítségét a kutatásomhoz használt minták gyűjtésében, köszönöm dr. Makrai Lászlónak és a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék munkatársainak a baktériumfajok izolálását.

Köszönettel tartozom dr. Hornok Sándornak, a Parazitológiai és Állattani Tanszék vezetőjének, akinek a segítsége nélkül a paraziták gyűjtése nem jöhetett volna létre, valamint dr. Tuska-Szalay Barbarának, aki az egysejtűek azonosításában nyújtott segítséget.

Hálás köszönettel tartozom a családomnak, páromnak és barátaimnak, akikre a legnehezebb pillanatokban is számíthattam, és a munkám folyamán végig támogattak és bíztattak.

## Témavezetői nyilatkozat

Alulírott **Dr. Kerek Ádám**, mint témavezető nyilatkozom, hogy **Csanády Péter** állatorvostan-hallgató **„Magyarországi eredetű propolisz hatékonysága galambból izolált kórokozók esetében”** c. dolgozata részt vehet az Állatorvostudományi Egyetem 2021. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján.

Budapest, 2021. október hó 18. nap.

.....

Dr. Kerek Ádám  
témavezető

## HuVetA

### ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT\*

Név: Csanády Péter .....

Elérhetőség (e-mail cím): [p.csanady99@gmail.com](mailto:p.csanady99@gmail.com) .....

A feltöltendő mű címe: Magyarországi eredetű propolisz hatékonysága galambból izolált kórokozók esetében.....

A mű megjelenési adatai: TDK 2021 .....

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 törvénytörő módon visszaélne.

Budapest, 2021. év október hó 18. 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: **Csanády Péter**.....

Neptun-kódja: **HSE360**.....

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

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

A diplomadolgozat címe: **Magyarországi eredetű propolisz hatékonysága galambból izolált kórokozók esetében** .....

Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2021.	02.	20.	Szakirodalmi átvétele	<i>[Signature]</i>
2.	2021.	03.	20.	Labormunka megkezdése	<i>[Signature]</i>
3.	2021.	04.	20.	Labormunka	<i>[Signature]</i>
4.	2021.	05.	20.	Labormunka	<i>[Signature]</i>
5.	2021.	06.	20.	Eredmények értékelése; összefoglalás	<i>[Signature]</i>

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

Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2021.	09.	20.	Iskolai előadás; Anyag- és módszer megismerés, megkezdés	<i>[Signature]</i>
2.	2021.	10.	20.	Eredmények összegzése; előadás	<i>[Signature]</i>
3.	2021.	11.	20.	Következtetések és az összefoglalás készítése; konzultáció	<i>[Signature]</i>
4.	2021.	12.	15.	Konzultáció; a diplomamunka átvétele; prezentáció előkészítése	<i>[Signature]</i>
5.	2022.	01.	10.	Prezentáció gyakorlati megbeszélés	<i>[Signature]</i>

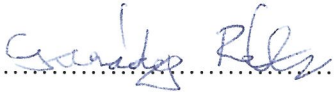
Érdemjegy a második félév végén: **Feles (5)**.....

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




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

A diplomamunka befogadható, védeésre alkalmasnak találtam.

Hallgató aláírása: 



témavezető aláírása

Tanszéki előadó aláírása: 

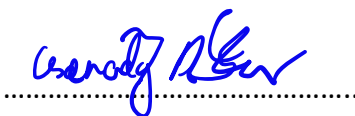
Átvétel dátuma: 2023.06.26.



## NYILATKOZAT

Alulírott Csanády Péter nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe Magyarországi eredetű propolisz hatékonysága galambból izolált kórokozók esetében, tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2021. évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2023.10.24.



a hallgató neve és aláírása